

HERTA STUTZ DALLA SANTA

**EFEITOS NO METABOLISMO E AÇÃO IMUNOMODULADORA
EM CAMUNDONGOS DO MICÉLIO DE *Agaricus brasiliensis*
PRODUZIDO POR CULTIVO NO ESTADO SÓLIDO**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor, no curso de
Processos Biotecnológicos, Universidade
Federal do Paraná.

Área de concentração: Saúde Humana e
Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2006

Dedico:

A Deus Pai Amor e Sabedoria, este trabalho é todo para ti o Senhor, como uma pequena oferta para que eu possa ser sempre teu instrumento nesta vida.

Em especial, a meu pai Konrad (in memoriam), obrigada por ter sido meu pai querido.

A minha mãe Theresinha, que junto com meu pai plantou várias sementes de bem em mim, entre elas o desejo do saber e da perseverança.

À Bruna, que com tua alma iluminada alegria minha vida em todos os momentos.

Ao Osmar, meu querido, que com teu amor e paciência sempre me incentivava a ir de encontro à minha realização pessoal.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, por seu meu orientador e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

A UNICENTRO, aos chefes e professores, que possibilitaram meu afastamento no período de 2003-2005 para dedicação exclusiva a este trabalho.

Aos professores Bonald Cavalcante Figueiredo e José Hermênio Cavalcante de Lima, pelo auxílio na elaboração do projeto enviado e aprovado pelo CNPq, e que resultou na verba para a execução deste trabalho. Ao CNPq, pelo financiamento da pesquisa e ao Paraná Tecnologia, pelo citômetro de fluxo.

A Rosália Rubel, companheira de muitos momentos e experimentos, obrigada por sua competência e dedicação. Obrigada também por tantas coisas belas que me ensinaste.

Aos estagiários, por sua ajuda, companheirismo e amizade, Andressa, Anne, Gerardo, Francisco, Lidiane, Andressa, e Kamille.

Ao Dr. Fan Leifa, que juntamente com o prof. Soccol, iniciou a linha de pesquisas em cogumelos no laboratório e se dedicou aos primeiros experimentos de verificação de sua atividade antitumoral, propiciando assim a continuidade através deste trabalho.

A todos dos Laboratórios de Processos Biotecnológicos I e II, pela amizade, colaboração, ânimo, tantas horas passadas juntas: Marlene, Silvia, Débora, Cristina, Bruno, Mityio, Flávera, Elza, Cristina, Cris, Cristine, Radjis, Michele, Juliana, Sascha, Luciana baiana, e Carol Maria, e todos que sempre estavam presentes no dia a dia do laboratório. Débora, muito obrigada pela ajuda na parte da dosagem do ergosterol, cultivo e respirometria.

Ao professor Luis Cláudio Fernandes, por sua competência, disponibilidade, sabedoria e paciência em tantos momentos. A toda equipe do Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia da UFPR.

A professora Dorli Buchi e toda sua equipe, por todas dúvidas que dissiparam e precioso ensinamento no Citômetro de Fluxo. Um agradecimento especial ao Raffaello, por sua didática e ajuda em momentos cruciais.

A Andréa N. Moreno e sua equipe, da PUC, por sua presteza e ajuda; e por ter cedido gentilmente o Sarcoma 180 e valiosos ensinamentos para o repique e implantação nos camundongos.

A Márcia Luciane Lange Silveira Silva, da Univille, que gentilmente nos cedeu novas células do Sarcoma 180 para os últimos testes deste trabalho.

Aos professores e amigos Luciana Vandenberghe, Adenise Woiciechoski, Júlio de Carvalho, Adriane Medeiros pela convivência e ajuda em diversos momentos.

A Michele, Cristiane Tagliari e André, pela discussão e ajuda nos cálculos de balanço de massa para formulação da ração.

Ao professor Juarez Gabardo, que com competência e alegria desmistificou a estatística.

Ao professor Yamamoto e pessoal do CEPPA, que nos auxiliou nas análises de toxinas. A Mari Luci da Silva Oliveira, por seus esclarecimentos no HPLC para as análises de ergosterol.

A professora Vanete Thomaz Soccol, por sua ajuda em obtermos os camundongos e por nos dar a oportunidade dos testes preliminares com *Leishmania*, que, apesar de aqui não constarem, serviram de incentivo para o aprofundamento das análises aqui apresentadas.

À professora Ana Lúcia Tararthuch, pelo empréstimo das gaiolas metabólicas e pela ajuda e disponibilidade.

À equipe do Biotério, pelo cuidado com nossos camundongos, pois sempre foram prestativos e amigos: Cândido, Izéli, Luis, Júlio, a todos.

A todos do Laboratório de Química Analítica Aplicada, Sônia, professor Paulo e professor Sossela, pela ajuda e amizade.

A todas da Secretaria em Doutorado em Processos Biotecnológicos da UFPR, Celina, Aparecida e Elisabete.

A Lisiane, Manoel e Sérgio, que me ajudaram pessoalmente em momentos difíceis, obrigada.

A dona Raimunda e demais servidores, que sempre mantém nosso ambiente de trabalho limpo e agradável, por sua tranquilidade e sabedoria de vida transmitida.

A Eva e Célia, meus “dois braços direitos” em casa, pela ajuda e alegria.

A minha família toda, que sempre me apoiou, animou e acreditou em mim, meu muito obrigado de coração.

A todos do Focolare, pelo imenso amor, sabedoria e constante ânimo para fazermos sempre a vontade de Deus Pai juntos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 CÂNCER	3
2.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO	4
2.2.1 Monócitos e Macrófagos	6
2.2.2 Linfócitos T	8
2.2.3 Linfócitos B	9
2.2.4 Células <i>Natural Killer</i>	10
2.2.5 Citocinas	10
2.2.6 Anticorpos monoclonais	12
2.3 MODIFICADORES DA RESPOSTA BIOLÓGICA	14
2.4 COGUMELOS	15
2.5 <i>Agaricus brasiliensis</i>	16
2.5.1 Nomes e classificação taxonômica	17
2.5.2 Produção e comercialização	18
2.5.3 Dados nutricionais	20
2.6 COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES	22
2.6.1 Polissacarídeos	23
2.6.2 Lectinas	25
2.6.3 Esteróis/Esteróides e ergosterol	25
2.6.4 Ácido linoléico	26
2.6.5 Fibras	26
2.7 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	27
2.7.1 Atividade anticlastogênica, antigenotóxica e antimutagênica	27
2.7.2 Atividade citotóxica e antiangiogênica	28
2.7.3 Atividade imunoestimulante	28
2.7.4 Atividade imunossupressora	34
2.7.5 Atividade antioxidante	34
2.7.6 Efeito hipolipidêmico, hipocolesterolêmico e antiarterioesclerótico	35
2.7.7 Efeito antihipertensivo	35
2.7.8 Efeito antidiabético	35
2.7.9 Atividade antiviral	36
2.7.10 Atividade bactericida	37
2.8 RECONHECIMENTO E RECEPTORES DE POLISSACARÍDEOS	37

3 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.9 METABOLISMO LIPÍDICO	39
3.1 MICRORGANISMO	42
3.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	42
3.3 REAGENTES	43
3.4 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO	43
3.5 PREPARO DO INÓCULO	44
3.6 CULTIVO SUBMERSO PARA DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	44
3.7 CULTIVO NO ESTADO SÓLIDO	44
3.7.1 Preparo do substrato	44
3.7.2 Inoculação do substrato sólido	45
3.7.3 Cultivo em colunas do substrato em meio sólido	45
3.7.3.1 Determinação da umidade inicial e vazão de ar	47
3.7.3.2 Cinética da produção de biomassa	47
3.7.3.3 Análise respirométrica	48
3.7.3.4 Estimativa de produção da taxa de consumo de O ₂ e produção de CO ₂	49
3.7.3.5 Estimativa de produção de biomassa	51
3.7.3.6 Extração e dosagem do ergosterol	54
3.7.4 Cultivo em frascos e bandeja em substrato sólido	55
3.8 PREPARO DA RAÇÃO	55
3.9 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> COM CAMUNDONGOS	57
3.9.1 Animais, grupos, tipos de rações e procedimentos	57
3.9.2 Manutenção da linhagem de Sarcoma 180 <i>in vivo</i>	61
3.9.3 Implantação do tumor sólido	62
3.9.4 Ingestão de água e coleta de urina e de fezes	62
3.9.5 Coleta de sangue	63
3.9.6 Análise do tamanho dos tumores e atividade antitumoral	64
3.9.7 Coleta de órgãos	65
3.9.8 Processamento dos órgãos	65
3.9.9 Marcação de células	66
3.9.10 Leitura no Citômetro de Fluxo	67
3.9.11 Análise de citocinas	70
3.9.12 Cultivo de macrófagos	71
3.9.12.1 Isolamento de macrófagos	71
3.9.12.2 Fagocitose	71
3.9.12.3 Volume lisossomal	72
3.9.12.3 Peróxido de hidrogênio	72
3.9.12.4 Ânion superóxido	73
3.9.12.5 Óxido nítrico	73
3.9.12.6 Determinação de proteína	73
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	74
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA POR DOSAGEM DE ERGOSTEROL	76
4.2 CULTIVO EM MEIO LIQUÍDO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>A. brasiliensis</i>	76

4.3 CULTIVO DE <i>A. brasiliensis</i> EM SUBSTRATO SÓLIDO A BASE DE TRIGO INTEGRAL	77
4.3.1 Análises do substrato e material cultivado	77
4.3.2 Determinação da biomassa em trigo cultivado por <i>A. brasiliensis</i>	78
4.3.3 Cultivo no Estado Sólido em colunas	78
4.3.3.1 Determinação da umidade inicial e aeração	78
4.3.3.2 Análise respirométrica	81
4.3.3.3 Determinação de parâmetros de bioprocessos	82
4.3.3.4 Cinética da produção de biomassa	83
4.3.4 Cultura no estado sólido em frascos e bandejas de <i>A. brasiliensis</i> em substrato a base de trigo	86
4.4 EFEITOS METABÓLICOS DA RAÇÃO PRODUZIDA POR TRIGO CULTIVADO COM <i>A. brasiliensis</i> EM CAMUNDONGOS	88
4.4.1 Evolução da massa corpórea	88
4.4.2 Peso corpóreo e de tumor	92
4.4.3 Ingestão de água e excreção de urina	93
4.4.4 Análises de urina e de fezes	95
4.4.5 Metabolismo protéico	97
4.4.6 Metabolismo glicídico	104
4.4.7 Metabolismo lipídico	107
4.5 EFEITOS IMUNOMODULADORES NOS CAMUNDONGOS	120
4.5.1 Redução tumoral	120
4.5.2 Células imunológicas	122
4.5.3 Citocinas	133
4.5.4 Atividade de macrófagos e parâmetros oxidativos	136
5- CONCLUSÕES	149
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
ANEXOS	173

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática do ciclo de vida de cogumelos.....	15
FIGURA 2 - Corpo de frutificação de <i>A. brasiliensis</i>	17
FIGURA 3 - Diagrama da molécula β -D-glicana de cogumelos.	23
FIGURA 4 - Possíveis mecanismos imunológicos desencadeados por Modificadores da Resposta Biológica, como D-glicanas.	29
FIGURA 5 - Representação esquemática dos possíveis alvos do sistema imunológico adaptativo para moléculas com propriedades imunomoduladoras de cogumelos.	38
FIGURA 6 - Esquema de sistema de biorreator tipo coluna com aeração forçada.	46
FIGURA 7 - Sistema de cultivo estático, cromatógrafo e computador utilizado na análise respirométrica.	49
FIGURA 8 - Etapas de preparo do trigo até obtenção da ração.	56
FIGURA 9 - Camundongos alimentados com a ração formulada para os experimentos. À direita, detalhe da forma contendo ração.	58
FIGURA 10 - Camundongos na gaiola metabólica, para coleta de urina e fezes.....	63
FIGURA 11 - Modelo esquemático de formação do complexo antígeno-anticorpo-fluorocromo formado durante a marcação das células para análise por citometria de fluxo.	67
FIGURA 12 - Representação esquemática do funcionamento de citômetro de fluxo.....	68
FIGURA 13 - Citômetro de fluxo FaC-Scalibur, semelhante ao utilizado para a leitura das células.....	68
FIGURA 14 - Citograma e gráfico do tipo “Contour plot” obtidos na leitura das células marcadas com FITC-CD3, de linfonodos do grupo A100 inoculados com Sarcoma 180.	69
FIGURA 15 - Estatística dos quadrantes dos dados da amostra de células marcadas com CD3, de linfonodos do grupo A100 inoculados com Sarcoma 180.....	70
FIGURA 16 - Microfotografia de micélio de <i>A. brasiliensis</i> LPB-03 (aumento de 400 vezes).	77
FIGURA 17 - Crescimento e biomassa produzida por <i>A. brasiliensis</i> em trigo com aeração forçada.....	79
FIGURA 18 - Efeito de umidade inicial e vazão de ar no cultivo de <i>A. brasiliensis</i> em trigo:em colunas.....	80
FIGURA 19 - Estimativa da Taxa de Consumo de Oxigênio, produção de gás carbônico, coeficiente de respiração QR, biomassa determinada, biomassa estimada e velocidade específica de crescimento μ (x 100) durante desenvolvimento de <i>A. brasiliensis</i> cultivado em meio sólido a base de trigo, em colunas com aeração forçada, com umidade inicial do substrato de 39% e vazão de ar de 10 mL.min ⁻¹	81
FIGURA 20 - Biomassa (ln) produzida por <i>A. brasiliensis</i> por cultivo em trigo em colunas, com 39% de umidade inicial do substrato e 10 (mL.min ⁻¹) de vazão de ar.	83
FIGURA 21 - Produção em frasco (1) e bandeja (2 e 3), de <i>A. brasiliensis</i> em trigo, após 18-20 dias de incubação.	87
FIGURA 22 - Variação de peso corpóreo, em g, de camundongos normais alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A.</i>	

	<i>brasiliensis</i> : grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	88
FIGURA 23 -	Variação de peso corpóreo, em g, de camundongos inoculados na décima semana com S-180 e alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A100-S e A50-S - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C-S - ração sem adição de cogumelo.	89
FIGURA 24 -	Variação de peso corpóreo, em g, de camundongos normais alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A10- ração com 2,9% de micélio, C - ração sem adição de cogumelo.	90
FIGURA 25 -	Variação de peso corpóreo, em g, de camundongos normais alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo C - ração sem adição de cogumelo; CLip - ração com adição de 5% de gordura saturada; A10Lip - ração com 2,9% de micélio e 5% de gordura saturada.....	91
FIGURA 26 -	Variação de peso corpóreo, em g, de camundongos inoculados na sétima semana com S-180 e alimentados durante 11 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A10-S - ração com 2,9% de micélio, C-S - ração sem adição de cogumelo.....	91
FIGURA 27 -	Volume de água ingerido, durante a quarta e nona semana, e de urina excretada, em intervalos de 15 h, de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	93
FIGURA 28 -	Concentrações plasmáticas de proteína total (acima), albumina (à esquerda) e globulina (à direita) de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , sem S-180: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	97
FIGURA 29 -	Concentrações plasmáticas de creatinina, uréia, ácido úrico, TGO, TGP de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , sem S-180: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	99
FIGURA 30 -	Concentrações plasmáticas de glicose de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	105
FIGURA 31 -	Concentrações plasmáticas de glicose de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A10- ração com 2,9% de micélio, C - ração sem adição de cogumelo.	105
FIGURA 32 -	Concentrações plasmáticas de glicose de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A10- ração com 2,9% de micélio, C - ração sem adição de cogumelo. grupos A10 Lip e C Lip - respectiva ração com suplementação de 5% de lipídeos saturados.....	106

FIGURA 33 - Concentrações plasmáticas de lipídeos totais, triacilgliceróis, colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.	108
FIGURA 34 - Relação HDL:colesterol plasmático, razão triacilgliceróis:HDL e índice aterogênico de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	110
FIGURA 35 - Concentrações plasmáticas de lipídeos totais, colesterol, triacilgliceróis, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, relação HDL-colesterol:colesterol total plasmático, razão triacilgliceróis:HDL-colesterol e índice aterogênico de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A10- ração com 2,9% de micélio, C - ração sem adição de cogumelo.	116
FIGURA 36 - Concentrações plasmáticas de lipídeos totais, colesterol, triacilgliceróis, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, razão HDL:colesterol plasmático, razão triacilgliceróis:HDL-colesterol e índice aterogênico de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo C - ração sem adição de cogumelo; CLip - ração com suplementação de 5% de lipídeos saturados, A10Lip- ração com 2,9% de micélio e 5% de lipídeos saturados.	118
FIGURA 37 - Camundongos do grupo controle com tumor e tumor depois de extirpado....	121
FIGURA 38 - Redução tumoral (%) de camundongos alimentados com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , inoculados com S-180: grupo A100, A50 e A10- ração com 29%, 14,5% e 2,9% de micélio, respectivamente.	121
FIGURA 39 - Peso do baço em mg per % de peso corpóreo dos de camundongos inoculados na décima semana com S-180 e alimentados durante 11 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A10-S - ração com 2,9% de micélio, C-S - ração sem adição de cogumelo.....	122
FIGURA 40 - Células esplênicas (%) de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	124
FIGURA 41 - Células de linfonodos (%) de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	127
FIGURA 42 - Células esplênicas (%) de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : A10 - ração com 2,9%, e C - ração sem adição de cogumelo.	130

FIGURA 43 - Células esplênicas (%) de camundongos alimentados durante 11 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> com inoculação de S-180 na sétima semana: grupo A10-S - ração com 2,9% e C-S - ração sem adição de cogumelo.	131
FIGURA 44 - Células de linfonodos axilares (%) de camundongos alimentados durante 11 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> com inoculação de S-180 na sétima semana: grupo A10-S - ração com 2,9% e C-S - ração sem adição de cogumelo.....	132
FIGURA 45 - Concentração de citocina plasmática TNF- α de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	134
FIGURA 46 - Concentrações de parâmetros oxidativos de macrófagos peritoneais: fagocitose, volume lisossomal, peróxido de H, ânion superóxido e óxido nítrico sem LPS e com LPS de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A10- ração com 2,9% de micélio, C - ração sem adição de cogumelo.....	137
FIGURA 47 - Concentrações de parâmetros oxidativos de macrófagos peritoneais: fagocitose, volume lisossomal, peróxido de H, ânion superóxido e óxido nítrico sem LPS e com LPS de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo C - ração sem adição de cogumelo; CLip – ração com suplementação de 5% de lipídeos saturados, A10Lip- ração com 2,9% de micélio e 5% de lipídeos saturados.....	139

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Componentes nutricionais do corpo frutífero e micélio de <i>Agaricus brasiliensis</i>	20
TABELA 2 - Conteúdo de aminoácidos do corpo de frutificação seco de <i>Agaricus brasiliensis</i>	21
TABELA 3 - Avaliação de aminoácidos essenciais do corpo de frutificação seco de <i>Agaricus brasiliensis</i>	21
TABELA 4 - Umidade inicial do substrato e da vazão de ar em colunas para <i>A. brasiliensis</i> LPB-03 cultivado em trigo.....	47
TABELA 5 - Composição centesimal de ração comercial e do trigo <i>in natura</i> utilizado como base para formulação da ração.....	56
TABELA 6 - Composição de solução polivitamínica utilizada como suplemento para os camundongos durante o período do experimento.	57
TABELA 7 - Características dos anticorpos fluorescentes monoclonais utilizados nos experimentos com camundongos.....	66
TABELA 8 - Área dos cromatogramas, concentração de ergosterol, biomassa produzida e pH final em cultura líquida em função do tempo.	76
TABELA 9 - Composição centesimal de trigo e trigo cultivado utilizado como base para formulação da ração para alimentação de camundongos nos Experimentos I e II.....	77
TABELA 10 - Área do cromatograma, concentração de ergosterol e biomassa produzida em cultivo sólido (trigo integral) por <i>A. brasiliensis</i> em colunas com aeração forçada em função do tempo.	78
TABELA 11 - Valores do tempo, da biomassa determinada, do CO ₂ produzido e da taxa de consumo de O ₂ de <i>A. brasiliensis</i> cultivado em meio sólido a base de trigo, em colunas com aeração forçada, com umidade inicial do substrato de 39% e vazão de ar de 10 mL.min ⁻¹ , usados para cálculos da biomassa estimada e outros parâmetros cinéticos através do programa Fersol.....	82
TABELA 12 - Peso corpóreo, do tumor e da carcaça dos animais portadores de Sarcoma 180, no período de 30 dias, dos grupos: C-S ração sem adição de cogumelo, A100-S e A50-S - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente.	92
TABELA 13 - Peso corpóreo, do tumor e da carcaça dos animais portadores de Sarcoma 180, no período de 30 dias, dos grupos: C-S ração sem adição de cogumelo, A10-S - ração com adição de 2,9%.....	93
TABELA 14 - Características físico-químicas em urina de 15 horas, proveniente de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	96
TABELA 15 - Exame parasitológico, sangue oculo e gordura fecal de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> : grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	96
TABELA 16 - Concentração de citocinas de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração	

	com 2,9% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.....	133
TABELA 17	- Concentração de citocinas plasmáticas de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , grupo A10 - ração com 2,9% e de micélio e C - ração sem adição de cogumelo.	135
TABELA 18	- Concentração de citocinas no sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de <i>A. brasiliensis</i> , grupo A10 - ração com 2,9% e de micélio e C - ração sem adição de cogumelo.....	135

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	- Grupos e tipos de rações utilizados nos Experimentos I, II e III.....	77
QUADRO 2	- Procedimentos e análises utilizados nos Experimentos I, II e II.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

Aw	Atividade de água
A10	Grupo Agaricus 10
A100	Grupo Agaricus 100
A100-S	Grupo Agaricus 100 com Sarcoma 180
A10Lip	Grupo Agaricus 10 lipídico
A10-S	Grupo Agaricus 10 com Sarcoma 180
A50	Grupo Agaricus 50
A50-S	Grupo Agaricus 50 com Sarcoma 180
C	Grupo Controle
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEPPA	Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos
CLip	Grupo Controle Lipídico
CS	Grupo Controle com Sarcoma 180
HC	Hospital das Clínicas
HDL	High Density Level
HMG-CoA	3-hidroxil-3-metilglutaril-CoA-redutase
IDL	Intermediate Density Level
IFN	Interferon
IG	Imunoglobulina
IL	Interleucina
kDa	kiloDalton
LAK	Células <i>Killer</i> Ativadas por Linfocinas
LDL	Low Density Level
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Fator ativador e Quimiotático de Monócitos
MHC	Complexo Maior de Histo-compatibilidade
mmHG	mm de mercúrio
MRB	Modificadores da Resposta Biológica
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
PBS	Phosphate-Buffered Saline – tampão fosfato salina
PMN	Polimorfos Nucleares
QR	Quociente respirométrico
S-180	Sarcoma 180
SMF	Sistema Monocítico Fagocitário
TAG	Triacilgliceróis
TAM	Macrófagos Associados ao Tumor
Tc	Linfócitos T citotóxicos
TCO	Taxa de Consumo de Oxigênio
TCR	<i>T cell receptor</i>
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Ts	Linfócitos T supressores
VLDL	Very Low Density Level

RESUMO

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei*, *Agaricus subrufescens*) possui propriedades imunoestimulantes e antitumorais. O presente trabalho teve por objetivos produzir micélio de *A. brasiliensis* no estado sólido em grãos de trigo e avaliar o efeito da ingestão deste material sobre o metabolismo lipídico e sua ação imunomoduladora em camundongos na ausência e presença do Sarcoma-180. A biomassa, produzida por cultivo no estado sólido, mensurada por ergosterol resultou em 29% ou 0,291 g de biomassa fúngica por grama de material cultivado seco. A análise respirométrica do processo realizado em biorres do tipo colunas com aeração forçada resultou em um pico de produção de CO₂ de 7,48 μmol e estimativa de velocidade de consumo de O₂ de 6,22 μmol às 69 h de cultivo. O rendimento da biomassa foi determinado ($Y_{X/O}$) em 1,949g de biomassa por g de O₂ consumido, com coeficiente de manutenção de biomassa (m_x) de 0,0027 g de O₂ consumido por g de biomassa produzida por h. A produção máxima de biomassa estimada ocorreu às 242 horas de cultivo com X de 24,081 g.100g⁻¹, com velocidade de crescimento específica (μ) de 0,087 h⁻¹; e em 18 h de cultivo o $\mu_{\text{máx}}$ alcançou o valor de 0,162 h⁻¹. A ração formulada com o trigo cultivado foi testada *in vivo* em camundongos divididos em grupos denominados A100, A50 e A10, com as respectivas dosagens de 29%, 14,5% e 2,9% de micélio de *A. brasiliensis*. Metade dos animais de cada grupo foi inoculada com Sarcoma 180 e a outra parte com solução salina. O peso dos animais, as análises de urina e de fezes, ingestão de água não apresentaram alterações importantes entre os grupos A100 e A50. Importantes alterações ocorreram no metabolismo lipídico dos camundongos normais dos grupos A100 e A50, com redução nos lipídeos totais e colesterol total, e decréscimos de 14% e 36% para triacilgliceróis e aumentos de 61% e 115% para a concentração de HDL-colesterol plasmáticos, respectivamente. Estes dados representaram uma redução de 48% e 70% na relação triacilgliceróis: HDL-colesterol plasmático e decréscimo de 65% e 96% no índice aterogênico dos animais dos grupos A100 e A50, respectivamente. O grupo A10 apresentou aumento de 13% nos valores do HDL-colesterol e redução de 53% no índice aterogênico. Na presença

do Sarcoma-180, nos grupos A100 e A50 foi constatado efeito redutor para lipídeos totais, e redução de 35% e 27% para os triacilgliceróis e de 34% e 25% para o VLDL-colesterol, respectivamente. A análise por citometria de fluxo de células esplênicas e dos linfócitos dos linfonodos axilares resultou em efeito estimulante sobre o sistema imunológico, com aumento da população de células B (CD19⁺) e células NK (CD16:32⁺) para os grupos A100 e A50. Foi detectada a produção de TNF- α e redução de células T *helper* - Th (CD4⁺) e de células citotóxicas ativadas (CD8:25⁺) nos linfócitos dos linfonodos axilares dos grupos A100 e A50. Para o grupo A10 não foi observado efeito de estímulo ou supressão sobre as células Th, T citotóxicas (CD8⁺), B e NK, mas foi detectado aumento na concentração plasmática de IL-6 e IFN- γ . Na presença do Sarcoma-180, nos grupos A100 e A10, detectou-se aumento de células B e Th dos linfócitos dos linfonodos e aumento das células NK e T citotóxicas esplênicas. Nos animais inoculados com tumor do grupo A100 foi observado redução de TNF- α e produção de IL-6. No grupo A10 na presença do tumor, observou-se redução na produção de óxido nítrico e de ânion superóxido por macrófagos peritoneais. A dieta com o cogumelo resultou em uma redução tumoral de 8,1% e 46,25% para os grupos A100 e A10, respectivamente. No grupo A50 foi detectado aumento de células Th, T citotóxicas do baço e dos linfonodos, com redução de células B e NK, redução de TNF- α e produção de IFN- γ , que resultou em redução tumoral de 55,23%.

Palavras-chave: *Agaricus brasiliensis*, micélio, cultivo no estado sólido, atividade hipolipidêmica, ação imunomoduladora e antitumoral.

ABSTRACT

The mushroom *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei*, *Agaricus subrufescens*) has immunostimulant and antitumoral properties. The present work aimed at producing the mycelia of *A. brasiliensis* on wheat grains by solid state cultivation and evaluating the effect of the ingestion of this cultivated material on the lipidic metabolism and on the immunomodulatory activity in mice, with and without Sarcoma-180. The biomass was produced by solid state cultivation and measured by ergosterol which resulted in 29% or 0.291 g fungi biomass per g of dry cultivated material. The respirometric analyses of the cultivation in column with forced aeration resulted in a peak of CO₂ production of 7.48 $\mu\text{mol.h}^{-1}$ and uptake velocity estimation of O₂ of 6.22 $\mu\text{mol.h}^{-1}$ at 69 h of cultivation. The biomass yield ($Y_{X/O}$) resulted in 1.949g of biomass per g of consumed O₂, with a biomass maintenance coefficient (m_x) of 0.0027 g of consumed O₂ per g of produced biomass per hour. The maximum production of estimated biomass occurred at 242 h of cultivation with X of 24.081 g.100 g⁻¹, and with specific growth velocity (μ) of 0.087 h⁻¹; at 18 h of culture the μ_{max} reached the value of 0.1617 h⁻¹. The chow formulated with the cultivated wheat was tested *in vivo* in mice divided in groups nominated A100, A50 and A10, with the respective dosages of 29%, 14.5% and 2.9% of mycelia of *A. brasiliensis*. Half of the animals of each group were inoculated with Sarcoma 180 and the other part with saline solution. The corporal weight, water ingestion, urine and faeces analysis did not present important alteration for A100 and A50 groups. It was noticed significant alterations in the lipidic metabolism of mice from A100 and A50 groups, with reduction in total lipids and total cholesterol, decreases of 14% and 36% for triacylglycerides and increases of 61% and 115% for serum HDL-cholesterol concentration, respectively. These data represented a reduction of 48% and 70% in the triacylglycerides: HDL-cholesterol plasmatic ratio and also a decrease of 65% and 96% in the atherogenic index of the animals from the groups A100 and A50, respectively. In the group A10 it was observed an increase of 13% in HDL-cholesterol values and reduction of 53% in the atherogenic index. In the presence of Sarcoma-180,

in the groups A100 and A50 it was detected a reduction in total lipids, as well as a decrease of 35% and 27% of triacylglycerides and 34% and 25% of VLDL-cholesterol, respectively. The flow cytometric analysis of splenic cells and lymphocytes from axilar lymphonodes resulted in a stimulant effect on the immune system, with increase of the B cells (CD19⁺) and NK cells (CD16:32⁺) in the groups A100 and A50. It was detected the production of TNF- α , reduction of T helper cells - Th (CD4⁺) and activated cytotoxic cells (CD8:25⁺) in the axilar lymphonodes of the A100 and A50 groups. In the A10 group, it was not observed stimulatory or suppressed effect on Th, T cytotoxic (CD8⁺), B and NK cells; however, it was detected an increase in the plasmatic concentration of IL-6 and IFN- γ . In the presence of the Sarcoma-180, in the groups A100 and A50, it was detected increase in the B and Th cells of the lymphocytes from the lymphonodes and increase in the NK and T cytotoxic splenic cells. In the animals from group A100 inoculated with the tumor it was observed reduction of TNF- α and production of IL-6. In the A10 group, in the presence of the tumor, it was observed a reduction in the production of nitric oxide and superoxide anion by peritoneal macrophages. The diet with the mushroom resulted in a tumoral reduction of 8.1% and 46.25% for the groups A100 and A10, respectively. In the group A50 it was detected an increase of Th and T cytotoxic cells in the spleen and in the lymphonodes, with reduction of B and NK cells, reduction of TNF- α and production of IFN- γ , which resulted in tumoral inhibition of 55.23%.

Key words: *Agaricus brasiliensis*, mycelia, solid state cultivation, hypolipidemic activity, imunomodulatory action and antitumoral.

1 INTRODUÇÃO

A manutenção da vida de forma harmônica, com saúde e por longo tempo é desejo inerente do ser humano. As doenças são ocasionadas pela ausência de homeostasia do organismo e podem levar a morte. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 30% dos óbitos que ocorrem todos os anos no mundo. No Brasil, os óbitos por doenças cardiovasculares ocupam o primeiro lugar no *ranking* de mortalidade por doença. O câncer, por sua vez, é o maior problema de saúde pública nos Estados Unidos e em países desenvolvidos; e normalmente uma em cada quatro mortes ocorre em função desta doença.

As terapias tradicionais envolvem o uso de estatinas para o caso de doenças cardiovasculares, cujo princípio ativo foi encontrado e extraído pela primeira vez de cogumelos. Outras terapias utilizadas são cirurgia, radioterapia e quimioterapia, para casos de câncer. A procura por alternativas inclui a imunoterapia, que se baseia no uso de modificadores da resposta biológica, que tem a propriedade de estimular o sistema imunológico. Assim, a utilização e procura por medicamentos ou substâncias que restauram a saúde ou auxiliam na prevenção de doenças inclui o uso milenar de ervas e cogumelos.

Os cogumelos, em especial *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei*, *Agaricus subrufescens*) descoberto nos anos sessenta, demonstrou possuir propriedades de modulação do sistema imunológico, com ação antitumoral. Este fato desencadeou seu uso popular crescente, o que inclui a ingestão do corpo de frutificação, micélio ou esporos, na forma de chás, tabletes, pós, cápsulas, de forma que atualmente é um dos cogumelos mais pesquisados mundialmente.

As pesquisas com *A. brasiliensis* estão focadas nas propriedades medicinais do polissacarídeo e de outros compostos como o ergosterol, ácido linoléico, fibras, hemiceluloses presentes no cogumelo. Os efeitos detectados e atribuídos ao cogumelo incluem ação anticancerígena, antiangiogênica, antimutagênica, e de uma forma geral

uma atividade estimulante, com poucos efeitos supressores, ou seja, modulador sobre o sistema imunológico.

As propriedades medicinais de *A. brasiliensis* foram pesquisadas em animais na presença de sarcomas, testando-se os extratos do corpo de frutificação ou do micélio, inoculando-se os polissacarídeos já extraídos e purificados, ou ainda pela ingestão do corpo de frutificação, mas normalmente os tratamentos foram realizados após a indução do tumor. Entretanto, não há pesquisas que comprovem o efeito do uso preventivo do cogumelo, em camundongos saudáveis, ou ainda, o efeito da ingestão do micélio em longo prazo, com indução do tumor após o tratamento.

1.1 OBJETIVO

Neste trabalho, as pesquisas foram focadas na produção do micélio de *A. brasiliensis* sobre grãos e verificar o efeito deste alimento em organismos saudáveis, após sua ingestão em longo prazo. Também foi pesquisado o efeito em animais alimentados durante longo prazo com este alimento, com posterior inoculação do tumor. A ação do micélio do cogumelo foi focada em análises das células imunológicas e citocinas, a fim de se observar o efeito sobre o sistema imunológico. Outras análises, englobando o perfil lipídico, glicídico, metabolismo renal e hepático possibilitaram ainda verificar sua ação sobre o organismo de um modo mais abrangente. Desta forma os objetivos deste trabalho foram:

- Produzir micélio de *A. brasiliensis* por cultivo no estado sólido sobre o substrato trigo integral e mensurar a quantidade de biomassa presente no material cultivado.
- Avaliar o efeito da ingestão do micélio de *A. brasiliensis* produzido sobre o trigo integral no metabolismo lipídico de camundongos na ausência e presença do Sarcoma-180.
- Avaliar a ação imunomoduladora da ingestão do micélio de *A. brasiliensis* produzido sobre o trigo integral em camundongos na ausência e presença do Sarcoma-180.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

Câncer é o maior problema de saúde pública nos Estados Unidos e em países desenvolvidos e, normalmente, um em cada quatro mortes ocorre em função desta doença. Para o ano de 2005, as estimativas eram de 1.399.790 novos casos de câncer, com 564.830 mortes, somente nos E.U.A. (JEMAL *et al.*, 2006). Segundo dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer), as estimativas para o ano de 2006 no Brasil, eram de 472.050 novos casos de câncer, e entre os mais importantes são citados: câncer de pele do tipo não melanoma, de mama, de próstata, traquéia, brônquios e pulmão, do colo do útero e do reto, de estômago (BRASIL, 2005).

O câncer foi conceituado pelo oncologista Sir Rupert Willis, como sendo uma massa anormal de tecido formada por células neoplásicas que têm crescimento celular desordenado e que continua a proliferar mesmo depois de cessada a causa que o induziu a proliferar, não respondendo mais aos mecanismos que controlam o crescimento celular (MONTENEGRO; FRANCO, 1999). Neoplasias ou tumores podem ser do tipo invasivos ou não invasivos (benignos). Os tumores não invasivos apresentam atipia celular discreta, crescimento lento sem infiltração para tecidos vizinhos, formação de massa geralmente esférica, e de vasos sanguíneos sem regiões com necrose. Tumores invasivos, também denominados de tumores malignos ou câncer, apresentam atipia celular acentuada, crescimento rápido que muitas vezes não é acompanhado pelos vasos e estroma, ocorrendo degenerações, necroses, hemorragias e ulcerações. Outras características são a incapacidade de diferenciação celular, aparecimento de novos antígenos na membrana destas células, perda de adesividade entre elas com conseqüente infiltração e disseminação para outros órgãos (metástase), com produção de fatores de crescimento. Na fase terminal ocorre o desenvolvimento da caquexia, síndrome paraneoplásica que tem por sintomas perda de peso corpóreo, intenso catabolismo e anorexia (TISDALE, 1999). Este quadro é proveniente da

demanda de energia dispendida no crescimento e manutenção do tumor e também pela ação de mediadores liberados pelas células do sistema imunológico, devido à presença principalmente do Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), que levam ao estado de degradação progressiva, fraqueza generalizada, anemia e emagrecimento acentuado (BRASILEIRO FILHO, 1998).

A carcinogênese pode ser dividida em três etapas: início, promoção e progressão. A fase inicial envolve a exposição ao agente mutagênico e, muitas vezes, requer transformação metabólica subsequente em formas biológicas ativas. Esta exposição, mesmo que cause danos permanentes no DNA, muitas vezes é insuficiente por si própria para causar câncer. A presença de promotor tumoral é necessária para estimular a divisão celular e assim, resultar em pequenos tumores benignos, em experimentos com animais e indução de tumores químicos. Possivelmente, uma fase promotora semelhante deve ocorrer em tumores de ocorrência natural. A progressão para tumor maligno ocorre quando é alterado o controle rígido que normalmente governa a progressão do ciclo celular, resultando em proliferação desordenada de células cancerosas. Esta etapa também envolve a habilidade destas células em invadir tecidos circunvizinhos e eventualmente metástase (BORSCHERS; KEEN; GERSHWIN, 2004).

2.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico é um conjunto de células e moléculas com papel especializado na defesa do organismo contra infecções e neoplasias, mantendo a homeostasia (BOURA *et al.*, 2001). Uma eficiente resposta imunológica ocorre com a participação de órgãos e de células especializadas, os leucócitos, que podem ser divididos em linfócitos e fagócitos. Os leucócitos granulócitos, derivados exclusivamente da medula, podem ser divididos em neutrófilos (ou Polimorfos Nucleares ou PMN), eosinófilos e basófilos. Já os linfócitos são agranulócitos e diferenciados entre si por marcadores de superfície denominados de CD (*Cluster of Differentiation/Designation*), com diferenciação das células em T, B e NK (*Natural Killer*). O terceiro grupo de células forma o Sistema Monocítico Fagocitário (SMF),

especializado em fagocitose e apresentação de antígenos, com destaque para os macrófagos (ABBAS *et al.*, 2000).

O sistema imunológico é dividido em inato (natural ou inespecífico) e adquirido (adaptativo ou específico). O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa e se caracteriza pela liberação de citocinas por parte dos macrófagos e de outras células. Por outro lado, o sistema imunológico específico é induzido ou estimulado pela exposição a substâncias consideradas estranhas pelo organismo, denominadas de antígenos. Esta é uma resposta específica, diversificada, auto-limitada, com memória e reconhecimento do próprio e não próprio, sendo controlada por linfócitos T diferenciados e por clones de células B. As células T e B possuem receptores de superfície para antígenos, sendo o TCR (*T cell receptor*) próprio para as células T e as imunoglobulinas de superfície (IG) próprias das células B (BLACK, 2002).

As respostas imunoespecíficas podem ser classificadas em humoral e celular. A imunidade humoral é desempenhada pelos linfócitos B, resposta esta mais eficiente contra toxinas, bactérias e vírus antes que estes penetrem nas células. As células B são produtoras dos anticorpos ou imunoglobulinas, proteínas produzidas em resposta a antígenos. A maioria dos antígenos é de natureza protéica, mas alguns são polissacarídeos, glicoproteínas e nucleoproteínas, presentes na superfície de vírus e de todas as células; podem ter vários epítomos, ou seja, regiões na superfície da molécula onde ocorre a ligação específica com os anticorpos (BLACK, 2002).

A imunidade celular é mediada por linfócitos do tipo T que possuem na sua superfície receptores de superfície para antígenos – TCR. Estas células são mais efetivas quando o antígeno faz parte da membrana celular ou está no interior da célula. Desta forma são mais eficientes contra células infectadas por vírus e participam das defesas contra fungos, órgãos transplantados e células cancerosas; especialmente tumores sólidos. No entanto, a imunidade humoral coopera com a resposta celular para uma ação conjunta na eliminação de células tumorais (BLACK, 2002; BRASILEIRO FILHO, 1998).

Assim como outras células do sistema imunológico, os linfócitos se desenvolvem a partir de células pluripotentes (*stem cells*) e a denominação de células

B ou T está relacionada ao local onde ocorre sua maturação. Em humanos o processo de maturação dos linfócitos B ocorre na medula óssea, no baço ou nos tecidos linfóides associados ao intestino e do trato digestivo. Já a diferenciação dos linfócitos T ocorre no timo, na medula óssea ou em tecidos sob influência de hormônios tímicos. Após a diferenciação, tanto células B como T são encontradas em todos os tecidos linfóides – linfonodos, baço, tonsilas, adenóides e nos tecidos linfóides (BLACK, 2002; ROITT, 1999).

2.2.1 Monócitos e Macrófagos

Os monócitos, provenientes da medula óssea, circulam pelo sangue durante um a três dias, migram para diferentes tecidos onde se transformam em macrófagos residentes. Participantes do SMF, os macrófagos têm por principal função a fagocitose para a remoção de partículas antigênicas enquanto as células apresentadoras de antígenos processam e apresentam os antígenos às células T (ROITT, 1999). Os macrófagos são grandes produtores de interleucina-1 (IL-1) no momento da fagocitose; estimulando os linfócitos *Th* até o local da infecção, onde serão apresentados aos epítomos nos macrófagos. Além disso, a IL-1 estimula a expansão clonal dos linfócitos *Th* e linfócitos B específicos contra os epítomos.

Em presença de estímulos os macrófagos são ativados, ocorrendo rápido aumento em sua atividade metabólica, motilidade, atividade fagocítica e de tamanho, podendo chegar ao dobro ou triplo do tamanho original. Os estímulos que possibilitam sua ativação são vários, tais como contato direto com microrganismos, partículas inertes, lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), produtos do próprio tecido danificado, componentes protéicos do sistema complemento ou citocinas, especialmente o interferon gama (IFN- γ) que pode ser secretado por linfócitos que estejam ao seu redor (ROITT, 1999).

Os macrófagos ativados possuem grande capacidade microbicida e tumoricida, pois são capazes de produzir grandes quantidades de metabólitos reativos do oxigênio e nitrogênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), O_2^- , OH^- e óxido nítrico (NO) (JORENS *et al.*, 1995). O NO é importante molécula efetora de atividade e citotóxica

contra parasitas intra e extracelulares e células tumorais (ROITT, 1999). O NO é uma molécula instável em solução aquosa, apresentando meia vida entre 3 a 15 s. Devido a sua instabilidade, a produção de NO é mensurada através da determinação da concentração de seus produtos oxidativos: nitrito e nitrato, no soro ou sobrenadante de culturas celulares (KWON *et al.*, 1990; LEONE *et al.*, 1991). A NO sintase induzível é expressa em macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, ativada por IFN- γ (Interferon- γ), TNF- α e LPS. Após a indução da enzima e produção de grandes quantidades de NO, esta molécula participa de atividades tumoricidas e citotóxicas. Assim, a produção de NO pode ser considerada uma característica típica de macrófagos ativados (DING *et al.*, 1988; MARLETTA, 1993; NATHAN; XIE, 1994). Além disso, ao secretarem citocinas regulatórias como TNF- α , IL e fator de crescimento de fibroblastos, os macrófagos participam do controle da proliferação diferenciação dos próprios macrófagos, função efetora de linfócitos e de outras células envolvidas na resposta imunológica (BIANCHI; SACERDOTE; PANERAI, 1998).

Macrófagos são células importantes na imunidade tumoral como células apresentadoras de antígenos, para iniciar a resposta imune e são muito eficazes na destruição de células tumorais, lisam as células cancerosas através da produção de TNF- α , liberação de radicais livres de oxigênio ou por citotoxicidade dependente de anticorpos. Por outro lado, os macrófagos podem infiltrar os tumores, sendo denominados de macrófagos associados ao tumor (TAM), onde apresentam um complexo relacionamento com as células tumorais. Os dois tipos celulares produzem fatores de crescimento recíprocos, TAM produzem fatores de crescimento que induzem a vascularização e as células tumorais liberam fatores indutores quimiotáticos, os quais induzem a migração de monócitos a partir do sangue, como o fator ativador e quimiotático de monócitos (MCP-1) (MANTOVANI *et al.*, 1992). A interação destas células depende do número de monócitos recrutados *in situ*, seu estado de ativação e as propriedades intrínsecas das células tumorais.

Macrófagos reconhecem partículas alvos através de seus receptores de superfície como o complexo apresentador de antígenos ou complexo maior de histo-

compatibilidade (MHC) do tipo I e do tipo II, envolvidos no processo de apresentação de antígenos para os linfócitos T (DEBRICK *et al.*, 1991).

2.2.2 Linfócitos T

Os linfócitos T possuem o receptor TCR específico para estas células, que reconhece somente antígenos peptídicos ligados ao MHC expresso na superfície celular de outras células, e não os antígenos solúveis. Funcionalmente, os linfócitos T são subdivididos em populações distintas, sendo as mais definidas as células T auxiliares (*Helper* ou *Th*), os linfócitos T citotóxicos (*Tc*), e existem ainda as células T supressoras (*Ts*). Todas estas células possuem, além do receptor TCR, o CD3 (ABBAS *et al.*, 2000). Os linfócitos T supressores possuem os receptores CD3 e CD8, e tem por função modular a resposta imune inibindo-a, pois inativa as células T citotóxicas e *Th*.

Os linfócitos *Th* possuem também o receptor CD4, cuja função é o reconhecimento de macrófagos ativados, especialmente através do MHC-II. Assim, os *Th* tem função de auxiliar ou induzir as respostas imunes, ou seja, função reguladora, pois estimulam o crescimento e proliferação de T citotóxicas e T supressores contra antígenos; estimulam o crescimento e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos para produção de anticorpos; ativam macrófagos e promovem a auto-estimulação. A IL-1 estimula a expansão clonal dos *Th* monoclonais, que por sua vez irão secretar vários tipos de ILs, e por isso são subdivididos em *Th*₁ e *Th*₂. Linfócitos *Th*₁ produzem IL-2 e IFN- α , associados com a citotoxicidade e reações inflamatórias e relacionados com a imunidade celular. Os linfócitos *Th*₂ secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10; sendo que a IL-4 e IL-10 estão ligadas à resposta imune humoral, sendo mais eficientes na estimulação da proliferação e produção de anticorpos pelas células B (ROITT *et al.*, 1999). Desta forma são caracterizadas as duas vias de estímulos imunes, denominadas de via 1 e 2. A via 1 é caracterizada pela produção de IL-2, IFN- γ e IL-12, e ativação de macrófagos, enquanto a 2 é reconhecida pela síntese de IL-4, -5, -6, -10, e -13, e promoção da imunidade humoral. De um modo geral, os polissacarídeos de cogumelos conseguem ativar ambas as vias (BORSCHERS; KEEN; GERSHWIN, 2004).

Quando uma célula estranha entra no organismo, ela expressa MHC-I na superfície, cuja expressão é ampliada por estímulos como IFN- α . Os linfócitos T citotóxicos possuem receptores CD8, com função de reconhecimento de MHC-I, expressa por células estranhas. Estas células são atacadas diretamente pelos T citotóxicos, sofrem lise e este processo é denominado de resposta imune celular específica. O principal estimulador é a IL-2, produzida por Th_1 , que causa a expansão clonal das células T citotóxicas.

O CD4 interage com células com MHC-II e CD8 com células MHC-I. As células Th não reconhecem diretamente a maioria das células tumorais, pois estas expressam moléculas MHC-I; assim, dependem dos macrófagos para apresentar-lhes os antígenos relevantes do tumor no contexto das moléculas da classe II. Após sua ativação, os linfócitos Th secretam citocinas que ativam as células T citotóxicas, macrófagos, células NK e células B; então ocorre também a produção de TNF, que pode lisar diretamente as células tumorais. Já a célula T citotóxica pode reconhecer e atacar diretamente a célula tumoral; porém, como não tem a capacidade de se auto-estimular, necessita da Th para sua ativação e proliferação (GREENBERG, 1994).

2.2.3 Linfócitos B

Os linfócitos B iniciam seu processo de maturação na medula óssea. As imunoglobulinas são seus receptores específicos de antígenos. Entre vários antígenos expressos na superfície dessas células, o CD19, CD20 e CD22 são os principais marcadores utilizados na identificação dos linfócitos B em humanos e camundongos (LAI *et al.*, 1998; ROITT *et al.*, 1999).

Em repouso, os linfócitos B não produzem imunoglobulinas, porém se proliferam quando estimulados por antígenos específicos, como IL-1 ou IL-4, ou artificialmente com LPS. Os linfócitos sofrem então expansão clonal e se transformam em células ativas, denominadas plasmócitos, que secretam ativamente imunoglobulinas específicas. Estas se ligam ao antígeno que lhe é apresentado direta ou indiretamente pelos macrófagos. Além da secreção de imunoglobulinas que podem contribuir para o controle do crescimento do tumor, os linfócitos B, ao entrar em

contato com o antígeno, expressam MHC do tipo II, que por sua vez reconhece o CD4 dos linfócitos *Th* que irão ajudar na maior ativação do sistema imunológico, com a produção de inúmeras IL indutoras. Ainda, as células B podem ser indutoras de respostas ao tumor pelas células T citotóxicas, pela secreção de IL-1 e IL-6 (GREENBERG, 1994).

2.2.4 Células *Natural Killer*

Estas células são derivadas da medula óssea e são células denominadas de matadoras naturais (*Natural Killer*, *NK*). Com ação diferenciada, sem necessidade de sensibilização prévia e sem necessidade de restrição ao MHC, matam células tumorais ou células infectadas por vírus, participando assim da resposta imune inespecífica. As células NK não expressam o marcador CD3, encontrado nas células T e B, porém, o marcador mais encontrado e utilizado atualmente para sua detecção é o CD16 ou CD56, ou ambos. A atividade citotóxica pode ser intensificada pelas respostas imunes de células T, pois na presença de IL-2 e IFN são originadas as células matadoras ativadas por linfocinas (LAK), que conseguem matar as células tumorais resistentes para as células NK (GREENBERG, 1994; SCHREIBER, 1999).

2.2.5 Citocinas

Estímulo do tipo invasivo ou neoplásico é capaz de ativar as células que sintetizam e secretam moléculas solúveis (citocinas) envolvidas na resposta imune. As citocinas (ou citoquinas) são responsáveis na emissão de sinais entre as células durante as respostas imunológicas. Cada citocina é produzida por determinados tipos celulares em resposta a vários estímulos e produzem efeitos característicos no crescimento, motilidade, diferenciação ou função das células alvo. Uma citocina pode desencadear a produção de outras citocinas ou mediadores, de forma a produzir uma cascata de efeitos biológicos (STITES, 1992). Como exemplos de citocinas podem ser citados o IFN, TNF, IL-2, IL-6, entre outras. Interleucinas são um grupo de citocinas (IL-1 até IL-18) produzidas principalmente por células T ativadas (ROITT *et al.*, 1999; JANEWAY *et al.*, 2000).

O TNF tem função crítica na resistência do hospedeiro à infecção e crescimento de tumores malignos. Atuando como imunoestimulante e mediando a resposta inflamatória, esta molécula é encontrada em duas formas, o TNF- α ou caquexina, e o TNF- β ou linfotoxina. Os linfócitos T ativados produzem TNF- β . Os principais produtores de TNF- α são os macrófagos ativados, porém esta molécula também é produzida em menores quantidades por células T, B, NK, LAK e inclusive algumas células tumorais. A produção em baixas concentrações de TNF- α promove a expressão de receptores de superfície pelas células endoteliais, favorecendo a aderência de leucócito que migram para os sítios de inflamação; ativa os macrófagos para produção de IL-1, IL-6 e TNF, e aumenta a expressão de moléculas MHC-I. Em grandes concentrações leva à caquexia, choque séptico e desordens auto-imunes (ABBAS *et al.*, 1999).

O IFN, uma família de proteínas com atividade antiviral e modulação das respostas imunes, é produzido por linfócitos T ativados, especialmente CD8, algumas células CD4 e também células NK. O IFN γ desempenha papel chave na defesa ao participar na resistência aos tumores, e é potente ativador de macrófagos, induzindo à produção de IL-6, IL-1, IL-8 e TNF, estimula monócitos e induz ao aumento de células NK, entre outras funções (STITES, 1992).

As células dendríticas (DC) têm papel importante na iniciação das respostas imunes das duas vias. Inicialmente, estas células apresentam antígenos específicos, para as células T virgens e assim providenciam a sinalização da via 1, para então providenciar por sinais co-estimulatórios, a estimulação da via 2 (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Como as células dendríticas mielóides se desenvolvem e maturam em diferentes condições e são funcionalmente diferentes, KALINSKI *et al* (1999) propuseram um novo conceito no qual as células dendríticas migrantes tomam uma via 3 adicional, regulando a diferenciação das células T virgens em Th_1 ou Th_2 .

A atividade biológica das citocinas engloba não só o recrutamento de células inflamatórias, mas também, na angiogênese hematopoiese e ativação de células imunocompetentes (YOSHIE *et al.*, 2001). Monócitos ativados, *in vivo*, podem se diferenciar em células dendríticas que migram para tecidos linfóides (RANDOLPH *et*

al., 1999) e que a produção de IL-12 por monócitos humanos ativados, mas não por células dendríticas, é suprimida por MCP-1 (BRAUN *et al.*, 2000). Células dendríticas geradas na presença de MCP-1 tiveram uma produção reduzida de IL-12, em resposta ao ligante CD40. A produção de IL-10, uma potente inibidora da IL-12, não foi afetada por MCP-1. MCP-1 significativamente regula a produção de IL-12 por monócitos que derivam em células dendríticas. Isto significa que a MCP-1 modula a diferenciação de monócitos em células dendríticas e pode inibir o desenvolvimento de células *Th1* (OMATA *et al.*, 2002).

A IL-12 é uma citocina com estrutura heterodímera, e consiste de duas subunidades, ligadas por pontes dissulfetos, denominadas de p40 e p35, sendo necessário a presença de ambas para que ocorra sua atividade biológica. Esta citocina exerce efeitos regulatórios sobre células T e NK e promove respostas *Th1*, pois possui habilidade para induzir células T e NK a secretarem IFN- γ , onde atua como fator de crescimento para células T e NK ativadas. Aumenta ainda a atividade de lise de NK/células assassinas ativadas por linfocinas (NK/LAC) e facilita as respostas citolíticas específicas de linfócitos. Sua função mais importante, possivelmente, é de regular o balanço entre células *Th1* e *Th2*. Tem papel essencial na regulação da produção de IFN γ e na facilitação de respostas de hipersensibilidade tardia. Entretanto, outros fenômenos associados com as respostas *Th1* e imunidade celular, como secreção de IL-2 e geração de células T citotóxicas não foram afetadas na ausência de IL-12 (MAGRAM *et al.*, 1996).

2.2.6 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais, produzidos pela tecnologia dos hibridomas, reagem com antígenos ou “marcadores” de determinadas células, possibilitando a identificação e discriminação de linhagens ou de estados de diferenciação destas células. Estes marcadores de superfície, com estrutura definida e que são reconhecidos por um grupo de anticorpos monoclonais, são designados de grupo de diferenciação ou “CD” e seguidas de um número; ou com a nomenclatura “Ly” para marcadores de camundongos (LAI *et al.*, 1998; ABBAS *et al.*, 2000).

O marcador CD3 é expresso por células T; os linfócitos T supressores possuem os receptores CD3 e CD8 e as células *Th* possuem CD4 e CD8. Os marcadores CD4 e CD8 são membros glico-protéicos transmembrânicos da superfamília das Igs, com estrutura distinta. O CD4 é formado por uma molécula de cadeia polipeptídica simples, de 55 kDa; já o CD8 apresenta uma cadeia CD8 α ligada por dissulfetos a uma cadeia CD8 β . O CD16 e ou CD32 são expressos por diferentes células como NK, monócitos, macrófagos, células dendríticas, granulócitos, linfócitos B, timócitos imaturos e por alguns linfócitos T maduros ativados. O anticorpo 2.4G2 reage especificamente com o epítipo não polimórfico comum nos domínios extracelulares dos receptores Fc γ III e Fc γ II de camundongos (PERUSSIA *et al.*, 1989; TAKEZAWA, *et al.*, 1995; JENSEN *et al.*, 2001).

O CD19 é uma glicoproteína transmembrânica de 95 kDa, um membro da superfamília das imunoglobulinas, expresso durante toda a maturação do linfócito B, e que deixa de ser expressa no plasmócito. O CD19 participa no desenvolvimento e ativação do linfócito B, na maturação dos linfócitos B de memória e na regulação da tolerância. O aumento nas concentrações de expressão de CD19 é correlacionado com aumento na frequência de células B1 peritoneais e esplênicas e com reduzido número de linfócitos B convencionais periféricos. (ENGEL *et al.*, 1995; RICKERT *et al.*, 1995; KROP *et al.*, 1996; SATO *et al.*, 1996; SATO *et al.*, 1997).

O anticorpo 7D4 reage com CD25, o receptor IL-2R cadeia α (IL-2R α) de baixa afinidade expresso por linfócitos T e B ativados. IL-2R α não é um receptor sinalizador por si próprio. Entretanto, pode se combinar com o receptor IL-2 de cadeia β (CD122) e γ_c (CD 132) com alta afinidade, sinalizando receptor para IL-2. CD25 também é expresso em baixas concentrações durante algumas fases de maturação de células B; e em concentrações mais altas durante um rápido estágio de desenvolvimento de células T, e também é secretado por células dendríticas. Entretanto, linfócitos T e B não ativados, células NK ativadas e não ativadas, e células B maduras não expressam IL-2R α (MALEK *et al.*, 1985; CHEN *et al.*, 1994; ROLINK *et al.*, 1994).

2.3 MODIFICADORES DA RESPOSTA BIOLÓGICA

A terapia convencional no tratamento do câncer utiliza a radio e quimioterapia e cirurgia, porém novas alternativas vêm sendo propostas. A imunoterapia baseia-se na revitalização das defesas naturais do organismo, de forma a re-estabelecer suas funções normais para a eliminação de tecidos neoplásicos ou anormais (KIDD, 2000).

Biomoduladores ou modificadores da resposta imune (MRB), ou imunopotenciadores, imunorestauradores, imunoaumentadores ou ainda imunoestimulantes, são agentes que modificam a resposta biológica do organismo por meio da estimulação do sistema imunológico que pode resultar em vários efeitos terapêuticos, segundo a primeira definição dada aos MRB por Brekhman em 1980 (WASSER; WEISS, 1999). Agentes MRB atuam no sistema imunológico específico, através de pelo menos um dos seguintes mecanismos: a) aumento direto da resposta antitumoral, ou do número ou na atividade das células efectoras, ou na produção de citocinas; b) aumento indireto da resposta imune por redução nos mecanismos supressores; c) aumento das defesas através de sua atuação como mediador natural ou sintético das respostas imunes; d) aumento na imunogenicidade ou alteração dos padrões metastáticos das células tumorais, tornando-as mais suscetíveis aos mecanismos de destruição imunológicos e agentes citotóxicos, através da modificação das características na membrana celular destas células (MITCHELL, 1998).

Imunocêuticos são substâncias, de ocorrência natural, utilizadas como principal ferramenta na imunoterapia. Estes agentes podem ser incluídos na categoria de nutricêuticos (KIDD, 2000). A atividade biológica destes constituintes dietéticos é amplamente pesquisada a fim de se determinar sua eficácia e dosagens adequadas, de forma a prevenir doenças (RIBEIRO; SALVADORI, 2003).

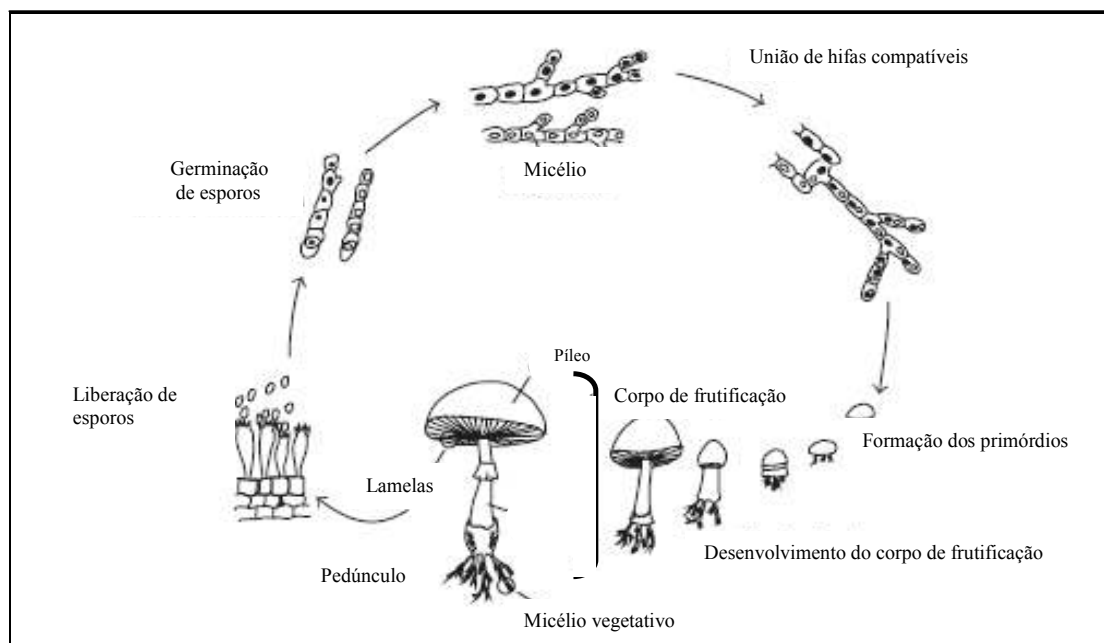
Várias substâncias derivadas de cogumelos apresentam ação imunoestimulante mais eficiente do que alguns agentes antineoplásicos. Imunocêuticos com atividade antitumoral foram isolados de mais de 30 espécies de cogumelos, e alguns como “lentinan”, “schizophyllan”, “Maitake D-fraction”, “Polisaccharide –K (PSK)” and “Polisaccharide –P (PSP)”, já são utilizados com comprovada eficácia em imunoterapia humana, principalmente no Japão, China, Coréia e países do leste da

Ásia. Estes compostos têm em comum na sua estrutura química serem β -D-glicanas, podendo ter ligações β -3, β -4, β -6, ou misturas destas, ou ainda proteínas (proteoglicanas). Como regra geral, proteoglicanas têm maior atividade antitumoral que suas glicanas livres correspondentes; e α -D-Glicanas de cogumelos usualmente não possuem atividade antitumoral (KIDD, 2000; LINDEQUIST *et al.*, 2005).

2.4 COGUMELOS

Cogumelos são macrofungos com um corpo frutífero distinto, que pode ser hipogeo ou epigeo, grande o suficiente para poder ser visto a olho nu, ser colhido com a mão, segundo definição de Chang e Miles. Entretanto, os cogumelos não são considerados uma categoria taxonômica (CHANG; MILES, 1992). O ciclo de vida dos cogumelos está representado esquematicamente na Figura 1.

FIGURA 1 - Representação esquemática do ciclo de vida de cogumelos



FONTE: adaptado de LULL; WICHES; SAVELKOUL, 2005.

Cogumelos têm sido reconhecidos por suas propriedades medicinais há muitos séculos. Numerosas espécies de Basidiomicetos são fontes de substâncias farmacêuticas, com propriedades potentes e únicas, assim como, de substâncias que

promovem a saúde (WASSER *et al.*, 2000). Cogumelos influenciam nas propriedades fisiológicas, como a bioregulação, manutenção da homeostasia, regulação do bioritmo, cura de doenças, prevenção e melhoras em doenças como câncer, derrame cerebral, e doenças coronárias. Recentemente está sendo confirmado também que cogumelos possuem substâncias efetivas para diminuição do colesterol, que ocasionam melhoras na hiperlipidemia, tem ação antitrombótica, reduzem pressão sanguínea, tem atividade hipoglicêmica, entre outros (WASSER; WEISS, 1999). Entre as principais atividades imunomodulatórias e antitumorais ocasionadas por cogumelos está a prevenção de oncogênese pelo consumo oral de cogumelos ou de seus preparados; atividade antitumoral direta contra tumores alogênicos e singênicos; atividade imunopotenciadora contra tumores em combinação com quimioterapias; e efeito preventivo de metástase tumoral (WASSER, 2002a).

Os estudos e pesquisas com cogumelos proporcionaram o desenvolvimento de diversos negócios, especialmente nas três últimas décadas. O cultivo de cogumelos movimentou o equivalente a 18 bilhões de dólares em 1999 a nível mundial, enquanto o mercado de produtos nutracêuticos a base de cogumelos é estimado em 6 bilhões de dólares por ano (WASSER, 2002b).

2.5 *AGARICUS BRASILIENSIS*

A. brasiliensis demonstrou ser um dos cogumelos anticancerígenos mais efetivos quando comparado com outros como Shiitake, Maitake (*Grifola frondosa*), Reishi, entre outros (WASSER, 2002a). A Figura 2 apresenta o corpo de frutificação do cogumelo *A. brasiliensis*.

Agaricus brasiliensis é um cogumelo originário da cidade de Piedade, em São Paulo, Br, onde foi descoberto em 1960 pelo produtor de cogumelos, Sr. Furumoto, que enviou esporos para o Japão em 1965. Os pesquisadores japoneses Dr. Ikegawa e Dr. Shibata iniciaram estudos comprovando seus efeitos benéficos para a saúde (WASSER *et al.*, 2002). Devido ao interesse despertado, este cogumelo voltou ao Brasil nos anos 90, para produção comercial dos corpos de frutificação.

FIGURA 2 - Corpo de frutificação de *A. brasiliensis*.



FONTE: Agaricus, 2004.

2.5.1 Nomes e classificação taxonômica

Conhecido inicialmente no meio científico por *Agaricus blazei* ss. Murill e *Agaricus blazei* ss, Heinem, popularmente recebe denominações populares como Cogumelo do Sol, Cogumelo da Vida, Cogumelo de Piedade, Cogumelo Princesa ou Cogumelo de Deus no Brasil, e Himematsutake no Japão, e ainda Royal Sun Agaricus em outros países.

Há divergências sobre a atual classificação taxonômica de *Agaricus brasiliensis*. Wasser e seus colaboradores fizeram um estudo aprofundado deste basidiomiceto em 2002, e propuseram a seguinte classificação taxonômica (WASSER *et al.*, 2002):

- Divisão: Basidiomycota
- Subdivisão: Homobasidiomycetidae
- Ordem: Agaricales
- Família: Agaricaceae
- Gênero: *Agaricus*
- Subgênero: *Flavoagaricus*
- Seção: *Majores*
- Subseção: *Flavescentes*
- Espécie: *brasiliensis*

Pesquisadores da EMBRAPA (URBEN *et al.*, 2005) baseadas em estudos de caracterização e morfologia, e devido a várias similaridades entre os diversos espécimes propõe a classificação taxonômica abaixo, sendo o *A. brasiliensis* considerado sinônimo de *A. blazei* e *A. silvaticus*:

- Gênero: *Agaricus*
- Subgênero: *Flavoagaricus*
- Seção: *Majores*
- Subseção: *Flavescentes*
- Espécie: *brasiliensis subrufescens*.

Estudos comparativos entre várias espécies realizados por KERRIGAN (2005) indicaram que esta espécie é biológica e filogeneticamente identificada com *Agaricus subrufescens* Peck, classificada em 1893, também nativa na América do Norte. Neste estudo o cogumelo foi denominado por *Agaricus subrufescens* Peck (sinonímia *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinemann, = *Agaricus brasiliensis* Wasser, Diduck, de Amazonas & Stamets), e os autores propuseram a seguinte classificação:

- Divisão: Basidiomycota
- Ordem: Agaricales
- Família: Agaricomycetideae
- Tribo: Agariceae
- Seção: Arvenses
- Gênero: *Agaricus*
- Espécie: *subrufescens*

Em função da falta de unanimidade a respeito do nome oficial e com o objetivo de facilitar o entendimento das diversas pesquisas já publicadas e relacionadas com este cogumelo, neste trabalho será utilizada a denominação de *Agaricus brasiliensis*.

2.5.2 Produção e comercialização

Pesquisas apontam poucas diferenças entre as diversas cepas de *A. brasiliensis* produzidas comercialmente no Japão e no Brasil (COLAUTO *et al.*, 2002; FUKUDA *et al.*, 2003). Não há dados oficiais atualizados da produção nacional, entretanto, a

produção brasileira foi estimada em 30 mil toneladas de cogumelo desidratado nos anos de 1996/97; com exportação de 90% para o Japão (BRAGA, 1998). O cultivo expandiu-se e desde 1996 é realizado também na Coreia, e mais recentemente, nos Estados Unidos (MIZUNO, 2000; DIAS *et al.*, 2004). O comércio via *World Wide Web* é realizado principalmente no Brasil, Japão e China, onde são vendidos produtos derivados como o corpo de frutificação seco, inteiro e moído, tabletes, cápsulas, extratos e chás (CHEN, 2001). Em 2005, o volume de importação de *Agaricus* no Japão foi estimado em cerca de 250 toneladas, 150 das quais provenientes da China, que é responsável por 45% do volume total; seguido do Brasil com 60 toneladas (35%), das quais 50 toneladas de cogumelos de "*Agaricus Blazei* Murril" proveniente do Brasil. Segundo os importadores japoneses de "*Agaricus*", o produto brasileiro é considerado de melhor qualidade e mais eficaz do que o produto chinês. Em razão disto, a marca "Brazil" tem se mantido popular no mercado japonês (BOLETIM DE MERCADO, 2006).

As pesquisas atuais apontam o potencial do emprego de *A. brasiliensis* como nutracêutico ou também denominado de nutricêutico, alimento funcional, suplemento dietético (CALPIS, 2001; RIBEIRO; SALVADORI, 2003; AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2004). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera as formas dessecadas inteiras ou fragmentadas e em conserva de cogumelos, incluindo o *Agaricus brasiliensis*, como alimentos e dispensados da obrigatoriedade de registro, conforme o informe técnico nº 6, de 31 de janeiro de 2003 (BRASIL, 2003). Em sua embalagem não poderá ser veiculada informação alusiva as suas propriedades que não sejam aquelas aprovadas pelo órgão competente da ANVISA.

Em 2005, a Comissão de Assessoramento Técnico-Científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF) e a Gerência-Geral de Alimentos da ANVISA atualizaram a lista dos Alimentos e Substâncias Bioativas com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde e Novos Alimentos (Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002), e através de evidências científicas (artigos em português ou em língua estrangeira) incluíram as β -glicanas com a seguinte alegação: "A beta glicana (fibra alimentar) auxilia na redução da absorção do colesterol. Seu consumo deve estar

associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. É possível comercializar os cogumelos em pó, cápsula, tablete ou comprimido, devendo conter na tabela de informação nutricional a quantidade da β -glicanas, como fibra solúvel, abaixo das fibras alimentares (BRASIL, 2002; BRASIL 2004; CAMELINI *et al.*, 2005a,b).

2.5.3 Dados nutricionais

A. brasiliensis é um cogumelo medicinal e comestível, sendo considerado um dos que alcançam maior valor comercial no mercado, e esta valorização é devida ao seu sabor peculiar, fragrância de amêndoas, excelente textura, com inúmeras possibilidades culinárias e valor nutricional, e principalmente em função de suas propriedades antitumorais e imunoestimulantes (STAMETS, 2000). Dados de composição química e centesimal deste cogumelo estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, comprovando seu alto valor nutricional, tanto do corpo de frutificação como do micélio, pois são encontradas quantidades grandes de proteínas e fibras. O corpo frutífero bruto/ *in natura* do cogumelo contém 85-87% água, sendo que seco é rico em carboidratos.

TABELA 1 - Componentes nutricionais do corpo frutífero e micélio de *Agaricus brasiliensis*.

Componentes	Conteúdo (base seca)	
	Corpo de frutificação *	Micélio**
Proteína (extrato bruto)	37-45%	12.21-20,48%
Lipídeo (extrato bruto)	0,85-4%	3,21-12,4%
Ácido linoléico (lipídeos totais)	70-78%	...
Ácido palmítico (lipídeos totais)	13-20,7%	...
Carboidrato total	38-47%	42,4-59,9%
Fibras	6-9%	7,03-26,4%
Polissacarídeos	0,92-2,4%	...
Cinzas	5-8,6%	5,9-16%
P	11,50 mg/g	...
B1	0,37 mg/100g	...
B2	3,66 mg/100g	...
Niacin	21,90 mg/100g	...
Ergosterol	135,57 mg/100g	...

Nota: Dados representam variação encontrada entre os diferentes autores. * Baseado em ZHONG *et al.*, (1999) MIZUNO (1989); SHIBATA e DEMIATE, (2003). **Baseado em CHANG *et al.*, (2001); HUANG *et al.*, (1999).

TABELA 2 - Conteúdo de aminoácidos do corpo de frutificação seco de *Agaricus brasiliensis*.

Aminoácidos	Conteúdo (%)	Aminoácidos	Conteúdo (%)
Asp	2.839	Met	1.857
Thr	1.511	Ile	1.698
Ser	1.358	Leu	2.290
Glu	6.571	Tyr	1.079
Pro	0.653	Phe	1.264
Gly	1.587	Lys	1.773
Ala	2.416	Trp	0.385
Cys	0.340	His	0.723
Val	1.503	Arg	2.190

FONTE: ZHONG *et al.*, 1999.

No corpo de frutificação, os aminoácidos essenciais totalizam 42.8% do total de aminoácidos presentes. O cogumelo possui um valor de aminoácidos equilibrado, conforme dados apresentados na Tabela 3, onde são comparados os valores mínimos de aminoácidos essenciais (ZHONG *et al.*, 1999).

TABELA 3 - Avaliação de aminoácidos essenciais do corpo de frutificação seco de *Agaricus brasiliensis*.

Aminoácidos essenciais (EAA)	Valores de aminoácidos (mg/g proteína)		Valor de EAA
	Referência Proteína (FAO/WHO, 1973)	<i>A brasiliensis</i>	
Ile	40	49.8	124.5
Leu	70	66.3	94.7**
Lys	55	51.2	93.1**
Met e Cys	35	64.9	185.4
Phe e Tyr	60	65.7	109.5
Thy	40	45.4	113.5
Trp	10	11.9	119
Val	50	44.6	89.2*

Nota * primeiro aminoácido limitante. **segundo aminoácido limitante (ZHONG *et al.*, 1999).

A presença de altas quantidades de ácidos graxos insaturados, linoléico e palmítico, podem ser co-responsáveis pelos efeitos benéficos atribuídos ao cogumelo *A. brasiliensis*. Os ácidos insaturados são responsáveis por efeitos carcinostáticos, por remoção de colesterol e atividade anti-trombótica (NUMATA; ISODA, 1986).

O meio de cultivo utilizado na produção de micélio influi na composição centesimal do mesmo e também na atividade biológica de seus metabólitos. A adição de zinco incrementou a atividade antitumoral dos polissacarídeos produzidos por fermentação submersa (ZOU, 2005).

A proteína hidrolisada do micélio de *A. brasiliensis* mostrou a presença de 14 aminoácidos (BLOCK *et al.*, 1953 *in* CHANG *et al.*, 2001). O total de aminoácidos livres chegou a 7,01 mg/g peso seco, dentre eles alanina e valina somam mais de 1.0 mg/g. O conteúdo de vitamina B do micélio de *Agaricus brasiliensis* foi determinado por McCANDLESS (1951 *in* CHANG *et al.*, 2001), os valores foram de 0,2 para tiamina, 3,4 – riboflavina, 14,6 – niacina, 6,9 mg/100g peso seco – para ácido pantotênico (CHANG *et al.*, 2001).

O micélio de *A. brasiliensis* é utilizado na formulação de produtos nutracêuticos e alimentos funcionais. O gosto levemente adocicado se deve à presença de aminoácidos como alanina e açúcares totais, que mascaram a presença dos ácidos aspártico e glutâmico, responsáveis pelo gosto amargo. Ainda, a presença de nucleotídeos-5' totais, responsável pelo “*flavour*” de carne, em conjunto com os outros compostos formam o sabor típico deste cogumelo (CHANG *et al.*, 2001). Os principais componentes da fração volátil são o benzaldeído e seu precursor, o ácido benzóico (STIJVE *et al.*, 2002). A composição química e os compostos que determinam o sabor, que estão presentes sugerem boa aceitabilidade de produtos alimentícios a base deste cogumelo.

2.6 COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES

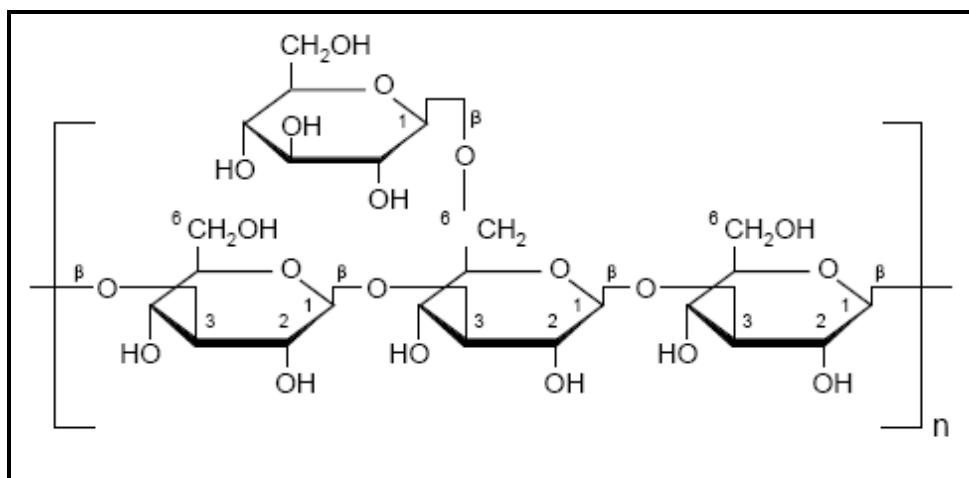
A potente atividade biológica atribuída a *A. brasiliensis* se deve aos seus compostos bioativos. A maior parte de componentes presentes e também mais pesquisados são os polissacarídeos. Outros compostos, como lectinas, esteróis e ergosterol vêm sendo pesquisados e tem demonstrado que em conjunto com os polissacarídeos, exercem sua ação fisiológica em diferentes metabolismos no organismo. Este cogumelo é muito utilizado para prevenir câncer, e como coadjuvante para pacientes em tratamentos contra câncer, como quimioterapia ou radioterapia.

Muitas vezes, seus extratos ou compostos derivados são utilizados na forma de chá, ou em conjunto com outras ervas (TAKEDA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2003a).

2.6.1 Polissacarídeos

A. brasiliensis é, dentre os cogumelos medicinais pesquisados, um dos que possuem a maior concentração de polissacarídeos; e ainda, o maior grupo de substâncias ativas presentes são os polissacarídeos ou proteoglicanas, cuja estrutura básica pode ser visualizada na Figura 3. Estas moléculas podem ser isoladas do corpo frutífero, do micélio e do meio de cultivo filtrado, sendo que existem vários tipos de polissacarídeos, a maioria com potente atividade antitumoral. *A. brasiliensis* possui diversos polissacarídeos, como proteo-glicanas com ligações β -1-6 na cadeia principal (ITO *et al.*, 1994); ou glicanas com ligações β -1-3 na cadeia principal e ligações secundárias β -1-6; complexos glicanas com α -1-6 e α -1-4 (MIZUNO *et al.*, 1998); e ainda glico-manose com cadeia principal de β -1-3 e ligações com resíduos D-manopiranosil (MIZUNO *et al.*, 1999). A forma de extração possibilita definir ainda os polissacarídeos em frações solúveis e insolúveis em água, de forma que a porção solúvel é composta basicamente por uma glicana β -(1-6),(1-3)-D, com variações na estrutura (DONG *et al.*, 2002); e as frações insolúveis são formadas por um complexo glicoprotéico- β -(1-6)-D (MIZUNO *et al.*, 1990b).

FIGURA 3 - Diagrama da molécula β -D-glicana de cogumelos.



FONTE: YANAKI *et al.*, 1983.

O desenvolvimento do corpo frutífero influencia na composição química de seus polissacarídeos; pois, de uma maneira geral, a maior parte dos polissacarídeos presentes é β -(1-6); já a quantidade de glicanas β -(1-3) é pequena em corpos frutíferos imaturos e aumenta durante sua maturação (CAMELINI *et al.*, 2005). A concentração de polissacarídeos é influenciada também em função das condições de produção; amostras produzidas em estufas apresentam uma concentração menor destes açúcares, quando comparadas com amostras cultivadas em campo aberto (PARK *et al.*, 2003).

O local e forma de produção em laboratório também demonstraram influenciar na estrutura dos polissacarídeos; assim, quando extraídos do micélio apresentaram ser complexos formados por proteo-glico-manose ou glicomanose com ligações β -(1-2); enquanto que no caldo de cultivo foram encontrados complexos de proteína e manose. Estas moléculas apresentaram estrutura completamente diferente dos polissacarídeos encontrados a partir do corpo frutífero de *A. brasiliensis*, de onde foram isolados diversas moléculas, solúveis e insolúveis em água como o complexo glicoprotéico- β -(1-6)-D, com moléculas glicana- β -(1-3). Inclusive, KAWAGISHI e seus colaboradores (1989) observaram pela primeira vez a ação antitumoral de glicanas- β -(1-6). A partir do extrato do corpo frutífero verificou-se também a presença de cadeias β -(1-4) nos polissacarídeos (KAWAGISHI *et al.*, 1989; MIZUNO *et al.*, 1990a,b; MIZUNO *et al.*, 1995; ITO *et al.*, 1997; MIZUNO *et al.*, 1999a,b; GONZAGA *et al.*, 2005).

A atividade biológica dos polissacarídeos está relacionada com sua solubilidade, seu tamanho e configuração. Polissacarídeos com peso molecular >1000 kDa incrementaram a produção de TNF- α por macrófagos de camundongos (linhagem RAW 264.7) em seis vezes, quando comparado com moléculas >30 kDa, confirmando assim a regra geral, de que moléculas grandes estimulam mais o sistema imunológico (SHU *et al.*, 2003). Além disso, frações de proteoglicanas apresentam menor atividade biológica do que a molécula inteira correspondente. Após a separação de uma glicana pura a partir de um complexo proteoglicano de *A. brasiliensis* foi verificado que esta não apresentou atividade antitumoral, sendo necessária, a presença acoplada da estrutura protéica (KAWAGISHI *et al.*, 1990). Entretanto, outros pesquisadores demonstraram que frações dos polissacarídeos também apresentam alta atividade

imune-estimulante. E ainda, as frações solúveis em água apresentam maior atividade antitumoral que as frações insolúveis (OHNO *et al.*, 2001). Para ativar as atividades biológicas nas células, a configuração primária dos polissacarídeos é mais importante que a terciária. A síntese de óxido nítrico por macrófagos é dependente da conformação de tripla hélice, enquanto a síntese de IFN- γ está apenas vinculada com a configuração primária (WASSER *et al.*, 2002).

2.6.2 Lectinas

Lectinas são complexos de proteínas e carboidratos, de origem não imune, que aglutinam células e precipitam polissacarídeos e conjugados glicolíticos. As lectinas possuem sítios de ligações específicas para açúcares, que irão se ligar nas moléculas glicosídicas presentes nas membranas das células. Lectinas presentes em outros cogumelos demonstraram possuir atividade regulatória sobre células e ativação de macrófagos e linfócitos (HO *et al.*, 2004). Uma lectina isolada a partir de *A. brasiliensis*, denominada de NA-aff-ABL, comprovou uma ação aglutinante frente a todos os tipos de eritrócitos humanos (KAWAGISHI *et al.*, 1988b). MIZUNO *et al.*, (1998) isolaram outra lectina, denominada de A-aff-ABL, e em testes com injeções intraperitoneais em camundongos contra Sarcoma 180, foi observado que esta molécula apresentou atividade antitumoral, porém de menor intensidade se comparado com a ação dos polissacarídeos deste cogumelo.

2.6.3 Esteróis/Esteróides e ergosterol

A partir do micélio de *A. brasiliensis* HIROTANI e colaboradores isolaram diversos esteróis denominados de “blazeispirol” do tipo A, B, C, D, E, F, X, Y, Z, entre outros, e elucidaram suas estruturas químicas e possíveis origens de algumas moléculas (HIROTANI *et al.*, 1999; 2000a,b; 2001; 2002a,b,c; 2003, 2005). Durante duas semanas de cultivo por fermentação submersa de *A. brasiliensis*, o principal produto encontrado no micélio foi o ergosterol. A produção de “blazeispirol” tipo A se iniciou em torno de duas semanas, ao mesmo tempo em que ocorreu o desaparecimento do ergosterol. O pico da produção do esterol ocorreu após quatro

semanas, com uma concentração de 60 mg.L⁻¹ no micélio do cogumelo. Estes esteróis são metabólitos secundários, produzidos pelo cogumelo.

Quatro esteróis, possivelmente formados por oxidação de ergosterol *in vivo*, foram isolados do extrato de acetona a partir de corpo frutífero de *A. brasiliensis* (KAWAGISHI *et al.*, 1988a,b). Destes compostos foram obtidas moléculas derivadas e três delas inibiram células cancerosas da cérvix uterina (células HeLa); sendo que as concentrações mínimas para completa inibição das células variaram entre 8 a 63 µg.mL⁻¹.

O ergosterol faz parte da fração lipídica e está presente na membrana celular de diversos cogumelos; e é um precursor de ergocalciferol, que possui comprovada ação antiangiogênica. A extração, isolamento e testes com o ergosterol, a partir do corpo frutífero de *A. brasiliensis*, possibilitaram demonstrar sua atividade antitumoral. Através da administração oral e intraperitoneal em camundongos portadores do Sarcoma-180 ocorreu uma diminuição no volume do tumor. Além disso, o ergosterol ou um de seus metabólitos, como o ergocalciferol, preveniu a neovascularização induzida por células do carcinoma Lewis Lung e conseqüente inibição da angiogênese (TAKAKU *et al.*, 2001).

2.6.4 Ácido linoléico

Um composto isolado a partir da fração metanólica do extrato de *A. brasiliensis*, e caracterizado como ácido linoléico, ou ácido *cis*-9-12-octadecadienóico, demonstrou possuir atividade antimutagênica, comprovada em testes *in vitro* contra o benzopireno (OSAKI, *et al.*, 1994).

2.6.5 Fibras

Fibras dietéticas possuem alto peso molecular, são excretadas sem serem digeridas e absorvidas pelo organismo humano (WASSER; WEISS, 1999). *A. brasiliensis* é rico em fibras dietéticas como β-glicanas, proteoglicanas e heteropolissacarídeos, com valores que variam em média de 8 a 15%, referente ao corpo frutífero e micélio, conforme dados apresentados na Tabela 1. A ação efetiva de

proteção ao câncer de colo e reto deve-se à atividade carcinostática das β -glicanas; à absorção que as fibras fazem de materiais carcinogênicos, impedindo sua absorção pelo intestino, e ainda, pelo aceleração do trânsito intestinal que ocasionam (MIZUNO, 1995; WASSER, 2002a,b).

2.7 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

2.7.1 Atividade anticlastogênica, antigenotóxica e antimutagênica

A modulação do sistema imunológico atribuída aos cogumelos, particularmente aos seus polissacarídeos, parece afetar os estágios de promoção e progressão dos tumores. Outras substâncias contidas nos cogumelos parecem ser capazes de atuar na iniciação do tumor através da melhora da capacidade antioxidante do hospedeiro ou por estímulo da regulação das fases enzimáticas I e II envolvidas na transformação metabólica. Diversos experimentos constataram efeito anticlastogênico, contra danos ao DNA, principalmente nas fases G₁ e S do ciclo celular, e que pode estar relacionado com a presença do ácido linoléico do cogumelo (DELMANTO *et al.*, 2001; BELLINI *et al.*, 2003; LUIZ *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2005). Efeito anti-genotóxico também foi verificado em células, *in vitro*, sob ação de ciclofosfamida, quando co-tratadas ou pré-incubadas com extrato do cogumelo (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Testes de mutagenicidade com o cogumelo *A. brasiliensis* demonstraram seu efeito negativo em testes Ames, de micronúcleos, aberração cromossômica mudanças cromátides e teste cometa (OSAKI *et al.*, 1994; MENOLI *et al.*, 2001; GUTERREZ *et al.*, 2004).

Popularmente o cogumelo *A. brasiliensis* é ingerido na forma de chá, com água quente ou de extrato aquoso, o qual é feito com 25 g do corpo frutífero seco e moído e deixado em suspensão por duas horas à temperatura ambiente em 1 L de água. Pesquisadores prepararam um extrato aquoso que foi adicionado à água de beber de ratos e camundongos, antes da indução de câncer por agentes químicos. Este extrato propiciou efeito antimutagênico, entretanto, não foi eficaz quando administrada na fase pós-indução (DELMANTO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; BARBISAN *et al.*, 2002; BARBISAN *et al.*, 2003). A administração do corpo frutífero moído a 10% na ração de ratos propiciou o efeito antimutagênico mesmo na fase pós-iniciação, o que

sugere a presença de compostos ativos que não são extraídos na forma de preparo do extrato aquoso (PINHEIRO *et al.*, 2003).

2.7.2 Atividade citotóxica e antiangiogênica

Outros constituintes presentes em *A. brasiliensis* parecem inibir a promoção ou progressão por ação citotóxica direta, *in vitro*, contra determinadas células tumorais, como HeLa (KAWAGISHI *et al.*, 1988). Efeito semelhante foi observado contra células frescas do tumor MethA. O extrato proteoglicano do cogumelo ocasionou diminuição da fase S destas células, enquanto as células linfocitárias esplênicas controle se mantiveram na fase G₀G₁, indicando ação citocida seletiva; e ainda, foi observada inibição direta do crescimento tumoral por indução de apoptose (FUJIMIYA *et al.*, 1998).

A interferência na angiogênese tumoral foi verificada, com inibição da neovascularização, através da ação do ergosterol (TAKAKU *et al.*, 2001) e do sódio piroglutamato, que inibiram o aumento da expressão do fator Willebrand, marcador de angiogênese (KIMURA *et al.*, 2004).

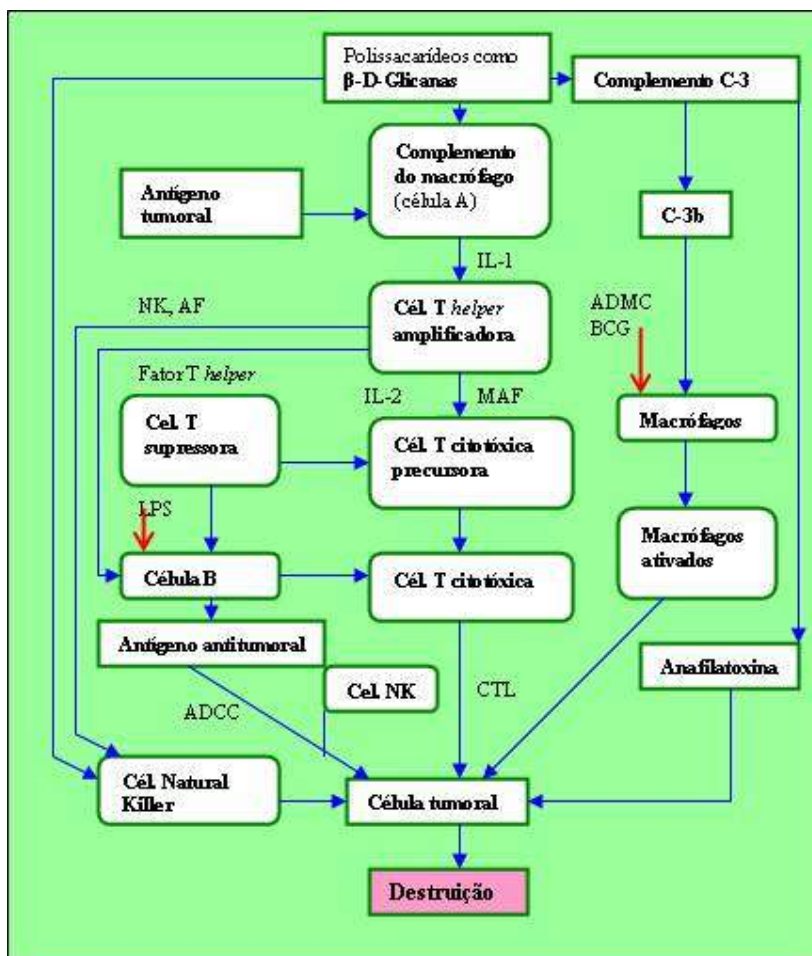
2.7.3 Atividade imunoestimulante

A atividade antitumoral de *A. brasiliensis* foi comprovada contra tumores singênicos e alogênicos, mediada por polissacarídeos e outros compostos, presentes tanto no corpo frutífero como no micélio deste cogumelo (FUJIMIYA *et al.*, 1998).

Todos os polissacarídeos possuem atividade antitumoral. Possivelmente, sua ação é mediada por células com diferentes receptores que então desencadeiam a estimulação do sistema imunológico (BORSCHERS; KEEN; GERSHWIN, 2004).

O extrato do cogumelo inteiro possui compostos que modulam a carcinogênese em diferentes estágios e/ou no mesmo estágio por diferentes mecanismos, conforme pode ser observado na Figura 4.

FIGURA 4 - Possíveis mecanismos imunológicos desencadeados por Modificadores da Resposta Biológica, como D-glicanas.



FONTE: adaptado de MIZUNO, 2002.

Os compostos bioativos presentes no cogumelo podem atuar de forma aditiva ou sinérgica, resultando no efeito preventivo e antitumoral observado. Esta regra, porém, não pode ser aplicada de modo geral. Frações etanólicas obtidas do extrato aquoso do corpo frutífero ou do micélio induziram a secreção de TNF- α e IL-8 em macrófagos da medula óssea. Frações subsequentes, extraídas com concentrações maiores de etanol, provenientes do micélio resultaram na redução da secreção destas citocinas e aumento na sua produção quando na presença de frações provenientes do corpo frutífero. Enquanto as primeiras frações do corpo frutífero não induziram a produção de NO (óxido nítrico), as frações com altas concentrações etanólicas

estimularam os macrófagos a produzirem concentrações mais elevadas do NO que do grupo controle (SORIMACHI *et al.*, 2001a).

Tratamentos com extratos aquosos do corpo frutífero de *A. brasiliensis* aumentaram as concentrações das células NK, MCP-1 (fator ativador e quimiotático de monócitos) e células TAM (macrófagos associados ao tumor) em camundongos BALB/c (FUJIMIYA *et al.*, 1998). Em outros experimentos foi verificado aumento de células NK esplênicas em camundongos BALB/c (TAKIMOTO *et al.*, 2004) e em camundongos ICR e atímicos KSN; onde também foi observado aumento de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD3⁺/25⁺, com atividade antitumoral significativa contra S-180 (LEE *et al.*, 2003b). Os extratos do cogumelo propiciaram aumento de células citotóxicas e produção de IFN- γ em camundongos BALB/c portadores do sarcoma MethA (EMTAGE *et al.*, 2003). Macrófagos e células dendríticas ativados produzem citocinas como IL-12, -15, -18, IFN- α/β que estimulam o aumento do número de células NK e também sua ativação e ainda, a IL-12 ativa células NK e T citotóxicas (YOKOYAMA *et al.*, 2004). A IL-12 é a promotora mais potente das respostas imunes da via 1 em células TCD4 e sua capacidade antitumoral *in vivo* é mediada via células NK (SMYTH *et al.*, 2000). Em camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich suplementados com extrato metanólico de *A. brasiliensis*, foi observado aumento das células NK durante os primeiros dez dias após inoculação do tumor. Este efeito não se manteve no 30^o dia após a inoculação, possivelmente em função de citocinas repressoras de NK, produzidas pelas células cancerosas (KANENO *et al.*, 2004). Em pacientes humanos com câncer ginecológico, que estavam em tratamento quimioterápico, o consumo do extrato de *A. brasiliensis* propiciou aumento da atividade de células NK e da qualidade de vida destes pacientes (AHN *et al.*, 2004).

A regressão completa do tumor MethA em camundongos BALB/c inoculados no modelo tumoral duplo, foi verificada com aplicação de fração do extrato aquoso do corpo frutífero de *A. brasiliensis*. As células tumorais induziram a produção do fator quimiotático de macrófagos, quando cultivadas, *in vitro*. As concentrações séricas da proteína ácida imunossupressiva, produzidos por macrófagos e neutrófilos ativados, aumentou após injeção intradermal de 0,5 mg de fração do extrato. Esta atividade

antitumoral foi correlacionada com reações imunes, que envolveram a indução de células citotóxicas no baço e liberação de fatores quimiotáticos no tumor que estava mais distante da aplicação do extrato do cogumelo (EBINA; FUJIMIYA, 1998).

Partículas finas do corpo frutífero e o micélio de *A. brasiliensis* ativaram a via alternativa do complemento no soro humano, com ligações aos complexos dos monócitos do sangue, e ainda, ocorreu inibição da proliferação de células tumorais da linhagem humana TPC-1 (SHIMIZU *et al.*, 2002). O polissacarídeo extraído do micélio ativou macrófagos peritoneais e aumentou as proporções das células complemento C-3 em camundongos (ITO *et al.*, 1997).

Componentes presentes em *A. brasiliensis*, como o sódio piroglutamato, inibiram a metástase, induziram ao aumento de células apoptóticas do tumor, de células TCD8⁺ e de células NK presentes na parte central do tumor, e inibiram a redução de células TCD4⁺ e TCD8⁺ (KIMURA *et al.*, 2004). Apoptose ou morte celular programada é processo fisiológico seletivo de eliminação de células, caracterizada por clivagem da cromatina nuclear, compactação das organelas citoplasmáticas, e aparecimento de protuberâncias pedunculadas na superfície celular. Além disso, as membranas mitocôndrias podem ser marcadas com o anticorpo anti-Apo2.7, como forma de marcação de células prestes a entrar em apoptose. Desta forma, verificou-se inibição do crescimento de células cancerosas por indução de apoptose na presença de extrato de *A. brasiliensis*, em experimento *in vitro* (FUJIMIYA *et al.*, 1998).

O extrato tratado do micélio de *A. brasiliensis* induziu a produção de IL-12 por monócitos peritoneais humanos, através das vias CD14 e TLR4 (Toll Like Receptors) sem, entretanto haver participação de TLR2. A população de células CD14⁺ é formada por monócitos e macrófagos imaturos, que possivelmente foram ativados na presença da fração do cogumelo para produção de IL-12, não havendo participação de células dendríticas neste processo. Além disso, houve aumento no número e atividade de células NK esplênicas. O efeito imunossupressor observado por KUO *et al.*, (2002) parece estar relacionado com altas doses de certos elementos, pois a produção de IL-12 não foi inibida com doses menores de 170 ng.mL⁻¹ (KASAI *et al.*, 2004). Este

aumento de IL-12 foi verificado também por Mizuno e seus colaboradores, juntamente com o aumento na produção de IL-18, a partir de um composto isolado da fração do extrato aquoso do cogumelo. Este composto estimulou macrófagos a produzirem um pico de TNF- α após 12 horas, o que levou a subsequente produção de NO após 24 horas. Macrófagos e monócitos produzem IL-12, que ativa a via 1 da resposta celular imune, enquanto a IL-18 é uma citocina pró-inflamatória importante na ativação de células NK e ativação da resposta via 1, além de, juntamente com o LPS, liberar o IFN- γ , principal mediador da ativação de macrófagos e de resistência a patógenos intracelulares (MIZUNO *et al.*, 2003).

O mecanismo antitumoral e antimetastático de *A. brasiliensis* foi verificado na presença de β -glicanas, extraídas do cogumelo, que suprimiram a proliferação celular e induziram apoptose, possivelmente através da promoção da ativação de p38MAPK. Os experimentos *in vivo* com administração oral de β -glicana resultaram em redução da metástase do tipo pulmonar com células 3LL (Lewis Lung Cells) e de células HRA (câncer ovariano). Entretanto, não foi verificado redução no número de colônias do tumor pulmonar quando a suplementação oral foi administrada após a inoculação intra peritoneal das células tumorais (KOBAYASHI *et al.*, 2005).

Algumas frações do extrato aquoso aumentaram a expressão de células pan T células, de CD4⁺ e CD8⁺ no baço (MIZUNO *et al.*, 1998). O extrato deste cogumelo propiciou aumento de células MAC-1⁺ e de CD25⁺, entretanto, não houve aumento no número de células CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ (linfócitos B). Como houve aumento da expressão de IL-1 e IL-6, tanto por macrófagos peritoneais como por células esplênicas, os autores sugeriram que o extrato ativou células T e macrófagos na produção destas interleucinas, as quais estão associadas na diferenciação de células B para células B produtoras de anticorpos, resultando no aumento de anticorpos produzidos (NAKAJIMA *et al.*, 2002).

As células dendríticas possuem papel importante no sistema imunológico, pois são co-responsáveis no reconhecimento de antígenos para então apresentá-los às células T e conseqüente ativação de todo sistema imunológico. A exposição a agentes estranhos e a ligantes CD40, assim como a estimulação via TNF- α e IL-1 β ativam as

células dendríticas, processo denominado de maturação, que após transformações morfológicas expressam moléculas co-estimuladoras na superfície e do MHC-1. O produto obtido do micélio tratado com hemi-celulases ativou as células dendríticas promovendo sua maturação. Entretanto, não ocorreu a produção de citocinas pró-inflamatórias, a produção de IL-12 foi suprimida e ocorreu diminuição da regulação das moléculas de superfície e do MHC-1 em células dendríticas tratadas com LPS. Entretanto, em cultivo de células T alogênicas, pré-tratadas com o produto a base de *A. brasiliensis*, ocorreu aumento das respostas Th_1 (KAWAMURA *et al.*, 2005).

Em experimento *in vitro* realizado por ELLERTSEN e colaboradores, foi verificada alteração na expressão gênica de fatores imunes causada pelo extrato de *A. brasiliensis* em monócitos humanos. Genes relacionados com as respostas inflamatórias relacionadas com a via Th_1 foram ativados, como a IL-8, IL-1b, IL-12B e TNF, enquanto não ocorreu expressão das citocinas típicas da via Th_2 , como IL-4, -5, -9 e -13, nem de marcadores de macrófagos, que estão associados com a diferenciação de monócitos. O efeito citotóxico foi verificado através de inibição de 63% na síntese do DNA e de 30% na inibição da síntese de proteínas, e ainda, ocorreu a indução de genes envolvidos com a apoptose e com a regulação do crescimento de células. O extrato do cogumelo demonstrou ser indutor de receptores ligantes ao RNA mensageiro que inibem a replicação do HIV, o que sugere seu potencial uso nos tratamentos de HIV. Foi observado também o efeito ativador em citocinas ativadores de monócitos e de neutrófilos, como C-C (Citocinas ligantes) e CXC (Small inducible cytokine B13), respectivamente. Os receptores de glicanas detectados foram o TLR2 e a dectin-1, enquanto não foi observada a presença de CD11b. A indução da expressão RGS1 (regulator of G-protein signalling 1) e as altas concentrações de IL-8 encontradas podem sugerir que o extrato pode estar envolvido na elucidação da direção de migração dos leucócitos. Igualmente interessante foi verificar a expressão da COX-2 ou PTGS2 (*prostaglandin-endoperoxide synthase*) e, em menores concentrações, da COX-1 (ELLERTSEN *et al.*, 2006).

2.7.4 Atividade imunossupressora

Um efeito imunossupressor foi verificado com uma das frações do extrato etanólico de *A. brasiliensis*, de forma a arrastar monócitos peritoneais humanos da fase G₁ para a fase S. Neste contexto, foi verificada a supressão da proliferação e expressão de citocinas como IL-2, -4, IFN- γ e ciclin D; enquanto a produção de ácido nítrico não foi afetada (KUO *et al.*, 2002). Em outro estudo, polissacarídeos do cogumelo resultaram em efeito supressor da expressão do citocromo P450 (CYP P450). A supressão da atividade da CYP P450 prolonga a duração e intensidade da ação de drogas, como medicamentos antitumorais, e ainda, contribui para a prevenção da carcinogênese, pois ativa metabolicamente agentes pro-carcinogênicos (HASHIMOTO *et al.*, 2002).

A ocorrência de efeito pró-tumoral em linhagem de células de câncer de mama - MCF7 foi detectado por TALORETE e colaboradores em 2002. Estas células possuem receptores de estrógeno; cuja ligação a esta molécula pode ocorrer pela via normal - ERE, ou pela via AP1 - do tipo *fos* ou *c-jun*, desencadeando a transcrição gênica. A ativação da enzima proteína quinase C (PKC) leva ao aumento da expressão da proteína *c-jun*, que induz à proliferação de algumas células. O extrato de *A. brasiliensis* promoveu aumentos na expressão desta proteína em células MCF7 (TALORETE; ISODA; MAEKAWA, 2002).

2.7.5 Atividade antioxidante

O cogumelo de *A. brasiliensis* possui excelente atividade antioxidante. O extrato possui compostos antioxidantes que são termoestáveis, tendo comportamento diferente de outras moléculas com esta propriedade, que normalmente são termolábeis e suscetíveis ao oxigênio atmosférico. Além disso, a γ -irradiação, muito utilizada na esterilização de alimentos, não interferiu na capacidade antioxidante. No fracionamento do extrato do cogumelo foi verificada que algumas frações possuem excelente atividade antioxidante, enquanto outras possuem maior habilidade redutora, quelante contra íons de ferro, e removedora de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e algumas delas demonstraram maior atividade quelante que o ácido

cítrico. Análises possibilitaram verificar a presença de várias moléculas, como ácido ascórbico, α , β e δ -tocoferol, e compostos fenólicos, que em conjunto propiciam sua excelente capacidade antioxidante. Isto demonstra o potencial uso deste cogumelo como produto antioxidante para aplicação na indústria de alimentos (HUANG *et al.*, 1999; IZAWA; INOUE, 2004; KER *et al.*, 2005).

2.7.6 Efeito hipolipidêmico, hipocolesterolêmico e antiarterioesclerótico

A ingestão oral do corpo frutífero de *A. brasiliensis* adicionado de ácido γ -aminobutírico e do micélio ocasionaram diminuição nas concentrações séricas de colesterol total e de triacilgliceróis em ratos, com melhora no índice aterogênico (valores de colesterol total menos HDL-colesterol divididos pelo valor do HDL-colesterol) (WATANABE *et al.*, 2002, YANG *et al.*, 2002; GOFMAN, 1956 *in*: STEINBERG, 2004;).

O mesmo efeito redutor nos valores séricos de lipídeos totais, colesterol total e triacilgliceróis foi verificado também em coelhos, após ingestão de extrato de *A. brasiliensis* e resultou em patente de produto antiarterioesclerótico (IWADE, 2004).

2.7.7 Efeito antihipertensivo

Atividade antihipertensiva foi verificada após ingestão oral do corpo frutífero adicionado de ácido γ -aminobutírico de *A. brasiliensis* em ratos. O micélio do cogumelo proporcionou efeito antihipertensivo menor. As duas moléculas demonstraram atividade inibitória sobre a Enzima Conversora da Angiotensina (ACE), por meio de uma substância ainda desconhecida (WATANABE *et al.*, 2002). Em um segundo estudo, o efeito antihipertensivo foi verificado em humanos levemente hipertensos, tratados com *A. brasiliensis* adicionado de ácido γ -aminobutírico (WATANABE *et al.*, 2003).

2.7.8 Efeito antidiabético

Repetidas extrações com água quente do corpo frutífero de *A. brasiliensis* foram realizadas para obtenção de β -glicanas, caracterizados complexos proteo- β -glicanas

com 30-50 kDa. A hidrólise destas β -glicanas originou oligossacarídeos, caracterizados como di e trissacarídeos, que demonstraram possuir atividade antidiabética, com aumentos significativos nas concentrações de insulina sérica, sugerindo a promoção da secreção de insulina pelas ilhotas de Langerhans do pâncreas, assim como a viabilidade e proliferação das ilhotas em ratos normais e diabéticos. As concentrações séricas de glicose não foram tão elevadas como as do grupo controle, e os autores sugerem que estas moléculas conseguiram estimular a regulação do metabolismo glicídico destes ratos. Ainda, ocorreu uma redução menor na perda de peso, característico da diabetes, dos animais tratados, promovendo melhoras no metabolismo alimentar (KIM *et al.*, 2005).

2.7.9 Atividade antiviral

Cogumelos apresentam atividade antiviral a partir de seus extratos ou de substâncias isoladas. Este efeito pode ser por inibição direta de enzimas virais ou da síntese de ácidos nucleicos virais, ocasionado pela ação de pequenas moléculas como peróxido de ergosterol, ou compostos fenólicos. O efeito inibitório indireto também pode ocorrer através da estimulação do sistema imunológico, normalmente pela ação de polissacarídeos e posterior por captura das partículas virais por determinadas células. A atividade antiviral de extratos do micélio de *A. brasiliensis* possibilitou inibição completa das alterações morfológicas induzidas pelo vírus de Encefalite Equina Western (WEE), em experimento *in vitro* (SORIMACHI *et al.*, 2001b). O extrato de *A. brasiliensis* demonstrou efeito imunoestimulante, ao ser co-injetado com a vacina de DNA contra vírus da hepatite B e em outro experimento, contra picornavírus do gênero *Aphovirus*, causador de doenças em boca e pés de suínos e gado em confinamento. O extrato do cogumelo possivelmente ativou os macrófagos, aumentando sua capacidade de apresentação às células B, ocorrendo maior produção de anticorpos específicos para cada um dos vírus. Um aumento na proliferação de células T esplênicas também foi observado, de forma que ocorreu incremento tanto da resposta imune celular como humoral. O extrato do cogumelo não apresentou efeitos colaterais como outros compostos utilizados como co-adjuvantes em vacinas,

demonstrando ser uma estratégia a ser utilizada para aumentar a eficiência de vacinas com DNA (CHEN *et al.*, 2004; CHEN e SHAO, 2006).

2.7.10 Atividade bactericida

Cogumelos necessitam de compostos antibactericidas e anitimicrobianos para sua sobrevivência no ambiente natural. Frações obtidas a partir de extrato do corpo frutífero de *A. brasiliensis* demonstraram possuir atividade antibactericida, e foram identificadas como ácido 13-hidroxi cis-9, trans-11-octadecadienóico, 13 ZE-LOH (OSAKI *et al.*, 1994). A atividade bactericida do cogumelo foi comprovada em camundongos, que foram tratados com o extrato de *A. brasiliensis* e inoculados com *Streptococcus pneumonia*. Os animais apresentaram níveis de bactericemia menores e aumentos de citocinas séricas como MIP-2 e TNF- α . Além disso, nos experimentos *in vitro* ocorreu ausência da atividade antibiótica, indicando a participação do sistema imunológico. A atuação do cogumelo foi mais efetiva ainda quando o extrato do cogumelo foi dado com 24 horas de antecedência à inoculação das bactérias. Os autores concluem que o extrato do cogumelo pode ser utilizado como agente profilático e possivelmente terapêutico contra bactérias e outras infecções em humanos (BERNARDSHAW; JOHNSON; HETLANDY, 2005).

2.8 RECONHECIMENTO E RECEPTORES DE POLISSACARÍDEOS

Polissacarídeos não atacam células neoplásicas diretamente; exercem sua ação antitumoral por ativação do sistema imunológico. Como estas moléculas são muito grandes para penetrar nas células, a fim de desencadear a modulação da atividade celular se ligam com os receptores das células imunes. Fragmentos grandes de polissacarídeos foram detectados no soro após ingestão oral de polissacarídeos, entretanto, algumas das atividades imunomodulatórias de responsabilidade dos polissacarídeos de cogumelos requerem polímeros maiores do que os detectados para sua ação. O tamanho mínimo necessário, para possibilitar a ligação entre glicanas e monócitos humanos, é um polímero composto por sete subunidades de glicose (LULL; WICHES; SAVELKOUL, 2005).

receptores CR3. Os receptores dectin-1 estão expressos na superfície de monócitos, macrófagos, células esplênicas e em menores concentrações nos linfócitos T. No intestino delgado o receptor dectin-1 também é encontrado, presente em células epiteliais ou dendríticas. A expressão de TLR-2, -3 e -4 foi encontrada em várias linhagens de células epiteliais intestinais. Assim, β -glicanas possivelmente interagem com as células epiteliais ou dendríticas, o que resulta na estimulação de células imunes (LULL; WICHERS; SAVELKOUL, 2005).

Células dendríticas, além de expressarem dectin-1 e TLRs, são capazes de coletar diretamente o conteúdo do lúmen intestinal, sem interferir com a integridade da camada epitelial. Isto propicia às células dendríticas uma rota de absorção de metabólitos bacterianos e talvez fúngicos, sem a necessidade da presença de macrófagos. Entretanto, ainda não é clara a relação entre estes dados e a ingestão oral de β -glicanas e, conseqüente, estimulação de células do sistema imunológico (BORSCHERS; KEEN; GERSHWIN, 2004).

2.9 METABOLISMO LIPÍDICO

Os lipídeos incluem as gorduras neutras (Triacilgliceróis - TAG), os fosfolipídeos e o colesterol. A estrutura química básica é formada por uma molécula de glicerol à qual estão ligadas três moléculas de ácidos graxos. As gorduras da dieta são absorvidas do intestino para a linfa após clivagem a monossacarídeos e ácidos graxos, sendo ressintetizadas em novas moléculas de TAG que se agregam formando as quilomícras. Em torno de 1% de proteína apoproteína b está acoplada à superfície das quilomícras, o que possibilita a estabilidade da suspensão no líquido da linfa, impede sua aderência às paredes dos vasos linfáticos e possibilita assim seu transporte plasmático (GUYTON; HALL, 2002). As quilomícras maiores, originadas da incorporação intestinal, pela via denominada de exógena, sofrem ação da lipoproteína-lipase e após liberação dos TAG e liberação dos ácidos graxos para captação pelas células adiposas e musculares, sofrem redução de tamanho e são denominadas de remanescente de quilomícra. Estas moléculas são clivadas dentro das células hepáticas liberando o colesterol livre, que será utilizado na síntese de membranas, para

armazenamento pelas células hepáticas, para a excreção na bile como colesterol ou após conversão em ácidos biliares, ou ainda, para formação das lipoproteínas e secreção no plasma, pela via endógena. As lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL- *Very Low Density Protein*, com diâmetro de 30 a 80 nm) são digeridas pela lipoproteína-lipase, originando as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL *Intermediate Density Protein*, de 25 a 35 nm), e após posterior remoção dos TAG formam as LDL (*Low Density Protein*, com 18 a 28 nm). As LDL são o reservatório de 60% a 70% do colesterol no plasma humano, sendo fonte para o fígado ou tecidos extra-hepáticos quando necessário para formação de novas membranas, por exemplo, através de formação de receptores de LDL em suas membranas e vice-versa. Esta regulação, por retro-alimentação, é a base de funcionamento de drogas que atuam na redução de concentrações plasmáticas de LDL (GOODMAN; GILMAN, 1998).

Os macrófagos também são responsáveis na degradação de LDL, pois possuem receptores específicos para captação destas moléculas alteradas, por exemplo, na presença de metais pesados, com conseqüente deposição do colesterol nas paredes arteriais, formando o ateroma ou placas ateroscleróticas. Outros fatores que podem desencadear a aterosclerose são a diabetes melito, hipotireoidismo e fumo. Acredita-se que as HDL podem absorver cristais de colesterol que estão começando a se depositar nas artérias e transferindo este colesterol para IDL e LDL para devolução no fígado. A maior parte do colesterol formado no fígado é convertido em ácidos biliares e secretado no duodeno; a seguir, mais de 90% destes ácidos são reabsorvidos no íleo e utilizados pela bile. Assim, compostos que se ligam com estas moléculas e impedem sua reabsorção no íleo acabam diminuindo a quantidade total de ácido biliar, e ainda, aumentam a conversão de colesterol em novas moléculas de ácido biliar, resultando em diminuição de LDL. Outro sistema de prevenção da aterosclerose é a utilização de compostos que inibem a enzima que limita a velocidade de síntese de colesterol no fígado, a 3-hidroxil-3-metilglutaril-CoA-redutase (HMG-CoA) reduzindo com isso a formação de colesterol, diminuindo a concentração de LDL em até 25 a 45% (GOODMAN; GILMAN, 1998).

Numerosas pesquisas apontam que concentrações elevadas de colesterol total ou de LDL-colesterol no plasma constituem importante fator de risco para o desenvolvimento de eventos ateroscleróticos (GOODMAN; GILMAN, 1998). A relação de redução de 1 mg.dL^{-1} de colesterol das LDL no plasma possibilita redução de até 2% no índice de mortalidade por cardiopatia aterosclerótica (GUYTON; HALL, 2002). Redução de 10% na concentração do colesterol sérico, ou seja, em $0,6 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, que pode ser obtido através de alteração da dieta, possibilita redução de 50% no risco de desenvolvimento de doenças coronárias em indivíduos na faixa dos 40 anos, e diminui para 20% na idade de 70 anos (LAW; WALD; THOMPSON, 1994). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares continuam sendo as principais causas de morte de homens e mulheres. Doenças desta natureza matam, anualmente, 17 milhões de pessoas no mundo – o equivalente a uma em cada três mortes (JAMISON *et al.*, 2006).

Entre os medicamentos hipolipidemiantes estão as estatinas, oriundas inicialmente de fungos, inibidoras da HMG-CoA redutase, ocasionando redução do colesterol total e do LDL, modulando o metabolismo das lipoproteínas com apoproteína B, e reduzindo os valores de TAG, ao mesmo tempo em que aumentam, ainda que modestamente, o colesterol das HDL (*High Density Level*). Alguns cuidados devem ser tomados na administração de estatinas, em função de possíveis efeitos adversos, como a hepatotoxicidade, miopatia e insuficiência renal. Pesquisas relatam que o efeito das estatinas inclui, além do efeito cardioprotetor, aumento na biodisponibilidade de óxido nítrico e efeito anticancerígeno (CHAN; OZA; SIU, 2003; LIAO, 2004; CALVERT; LEFER, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

A cepa de *A. brasiliensis* utilizada nos experimentos foi isolada por Fan Leifa, em Curitiba, no ano de 2000 (FAN, 2002). Pesquisas realizadas demonstraram que os exopolissacarídeos desta cepa possuem atividade antitumoral comprovada contra o Sarcoma 180 em camundongos (FAN *et al.*, 2003; LEIFA *et al.*, 2006). A cepa foi repicada para tubos de ensaio com ágar BDA (Batata Dextrose Ágar), incubado a 30°C por 10-12 dias, armazenada a temperatura ambiente e repicada a cada três meses. A cepa, designada por *A. brasiliensis* LPB-03, encontra-se depositada no cepário da Divisão de Engenharia de Bioprocessos & Biotecnologia da UFPR / do Laboratório de Processos Biotecnológicos-I (LPB-I).

3.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Todos os experimentos, ensaios biológicos e análises foram realizados na UFPR. Os experimentos de cultivo submerso, no estado sólido, de respirometria e formulação da ração foram realizados no LPB-I. A análise de composição centesimal foi realizada no Laboratório de Química Analítica, Setor de Tecnologia de Alimentos. A análise de toxinas no substrato a base de grãos de trigo foi realizada no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – CEPPA. As análises de ergosterol foram efetuadas no Laboratório de Microscopia, Espectrofotometria e Cromatografia, da Divisão de Engenharia de Bioprocessos & Biotecnologia da UFPR. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas. As etapas de preparo de marcação de células e de interleucinas foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular e LPB-II, da Divisão de Engenharia de Bioprocessos & Biotecnologia da UFPR. O cultivo de macrófagos e as análises correlatas foram executados no Laboratório de Fisiologia Celular, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas. A leitura em citômetro de fluxo foi realizada no Laboratório de Microscopia Confocal e Citometria de Fluxo, Setor de Ciências Biológicas.

3.3 REAGENTES

Os reagentes e meios de cultivo foram obtidos de Sigma Chemical CO. (ST. Louis, MO, USA); Merck (Darmstadt, Germany); Oxoid, (Hampshire, England); Gibco (California, EUA). Os grãos de trigo foram adquiridos na cooperativa Agrária (Guarapuava, PR) e o trigo do tipo “para quibe” no Mercado Municipal (Curitiba, PR). Os anticorpos monoclonais fluorescentes (Fluorescein Isothiocyanate – FITC - conjugated anti CD3⁺, anti CD25⁺; Phycoerythrin- PE -conjugated anti CD4⁺, anti CD8⁺, anti CD16/32⁺ e anti CD19⁺) foram adquiridos da BD Biosciences (California, EUA). As citocinas (IL-12p70 Interleukins - IL, IL-6, IL-10, IFN- γ Interferon gamma, TNF- α Tumor Necrosis Factor-alpha e MCP-1 Monocytes chemoattractant protein-1) foram adquiridos da BD Biosciences Pharmigen (California, EUA).

3.4 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

O pré-inóculo foi preparado em meio composto por (g.L⁻¹): glicose (20), extrato de levedura (3,95), MgSO₄.7H₂O (0,3), e K₂HPO₄.3H₂O (0,5); com pH ajustado a 6,0 ($\pm 0,2$) em potenciômetro com NaOH 0,1N (FAN *et al.*, 2003). O meio foi acondicionado em frasco Erlenmeyer (250 mL), na proporção de 50 mL por frasco, esterilizado a 121° C, pressão de um atm, durante 15 min, em autoclave vertical (Phoenix). A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar (Veco). A partir dos tubos de ensaio contendo BDA, cinco quadrados (1cm²) de ágar com micélio foram cortados com auxílio de alça de platina e transferidos para os frascos contendo o meio. A incubação foi realizada sob agitação de 120 rpm (rotações por minuto) em incubador rotatório de bancada refrigerada (Novatécnica), a temperatura de 30°C, por um período de sete dias. O micélio foi filtrado em tela (malha de 0,5 mm²), e com auxílio de uma espátula, esta biomassa foi passada suavemente através da tela com 50 mL de água destilada esterilizada. A suspensão de micélio quebrado foi denominada de pré-inóculo.

3.5 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 1 L, com 500 mL do meio estéril composto por (g.L⁻¹): glicose (35), extrato de levedura (2.5), peptona (5), KH₂PO₄ (0.88), MgSO₄.7H₂O (0.5), e pH ajustado com HCl (1N) a 5,5 (TANG e ZHONG, 2002). O meio foi inoculado com 10% do pré-inóculo e incubado durante sete dias, temperatura de 30°C, sob agitação de 120 rpm. A suspensão de micélio foi obtida por filtração em tela (malha de 0,5 mm²) utilizando 500 mL de água estéril destilada para lavagem da biomassa.

3.6 CULTIVO SUBMERSO PARA DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

Este experimento foi conduzido com o objetivo de determinar a produção de biomassa do fungo *A. brasiliensis* por cultivo submerso ao longo do tempo. O ensaio foi realizado com 500 mL de meio igual ao usado para preparo do inóculo (TANG; ZHONG, 2002), e inoculado com 50 mL da suspensão de inóculo, cuja concentração foi de 2,94 g.L⁻¹ ($\pm 10\%$) e incubado a 30°C, sob agitação de 120 rpm. Retirou-se um frasco Erlenmeyer com o meio cultivado nos tempos cinco, sete, 10 e 14 dias. O pH foi medido no início e no final do cultivo. A biomassa foi obtida por filtração em tela (malha de 0,5 mm²) e armazenada a -20° C para dosagem do ergosterol.

3.7 CULTIVO NO ESTADO SÓLIDO

3.7.1 Preparo do substrato

O cultivo no estado sólido para o cultivo de *A. brasiliensis* foi realizada com grãos de trigo inteiros em uma primeira etapa e com trigo do tipo “para quibe” na segunda fase. O trigo para quibe pode ser definido como o “grão de trigo integral que foi descascado, parboilizado, seco e então quebrado em pedaços e pode ter diferentes tamanhos” (SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS, 2006).

O trigo em grãos foi inicialmente lavado e deixado de molho em água limpa por 12 horas para absorção de água. Após escoamento do excesso de água o substrato foi acondicionado em frascos de vidro e em bandejas de polietileno (20x20x7cm), coberto

com papel filtro e papel Kraft, esterilizado a 121°C, pressão de um atm, durante 50 min em autoclave. Os frascos e bandejas foram colocados em estufa a 100°C para secagem do papel a fim de evitar contaminações, e em seguida, resfriados à temperatura ambiente. Amostras deste substrato foram submetidas à análise de micotoxinas, no CEPPA.

O trigo do tipo “para quibe” foi preparado com adição de água destilada até obter umidade inicial de 30%, em seguida foi acondicionado em bandejas e submetido às mesmas condições que o substrato trigo em grãos.

3.7.2 Inoculação do substrato sólido

Amostras do substrato esterilizado foram retiradas para análise de umidade (A.O.A.C., 1998) e de atividade de água (A_w) (AquaLab CX-2) antes da inoculação. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar com o inóculo preparado conforme descrito no item 3.5, na concentração de 0,653g ($\pm 2\%$) de micélio por Kg de trigo. Ao substrato inoculado foi adicionada a quantidade de água destilada estéril até obtenção de umidade inicial de 40% ($\pm 2\%$) (PANDEY *et al.*, 2001).

O substrato inoculado foi acondicionado em colunas de Raimbault para cultivo com aeração forçada com o objetivo de avaliar o efeito da aeração. Em uma segunda etapa o cultivo foi realizado nas próprias bandejas para posterior formulação da ração.

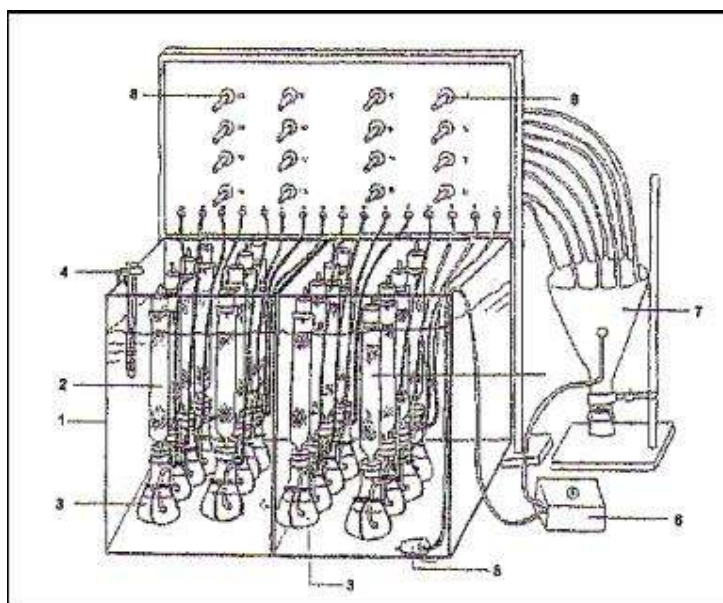
3.7.3 Cultivo em colunas do substrato em meio sólido

A produção de biomassa e avaliação do metabolismo respiratório em cultivo no estado sólido foi realizada em biorreatores do tipo coluna com aeração forçada, conforme esquema apresentado na Figura 6.

O sistema utilizado era composto por colunas de vidro (4 x 20 cm – diâmetro x comprimento, com volume útil de 250 cm³) com controle de aeração e temperatura, semelhante ao desenvolvido por RAIMBAULT *et al.*, (1980). O substrato utilizado foi trigo “tipo para quibe” (granulometria <2mm), o qual foi processado e inoculado da mesma forma que descrito no cultivo para produção da ração (item 3.3.1). Após o preenchimento com 45g (± 2 g) de material inoculado, as colunas foram conectadas aos

borbulhadores de ar (250 mL), contendo aproximadamente 150 mL de água destilada, cuja função era saturar o fluxo de ar antes de sua passagem pelo incubador. O fluxo de ar foi ajustado pelo sistema de válvulas e controlado diariamente com aerômetro/rotâmetro (OMEL), na saída de ar da coluna. O conjunto foi colocado em uma cuba de vidro com água, com controle da temperatura, por termostato, a 30 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$), e incubado durante 14 dias.

FIGURA 6 - Esquema de sistema de biorreator tipo coluna com aeração forçada.



NOTA: 1) Cuba de vidro; 2) Biorreatores tipo coluna; 3) Borbulhadores de ar; 4) Termostato; 5) Entrada de ar para agitação; 6) Bomba de ar; 7) Distribuidor de ar; 8) Válvulas de controle de aeração.

Três experimentos foram conduzidos neste sistema, o primeiro para verificar as melhores condições de umidade inicial do substrato e de aeração. O segundo e terceiro ensaios foram conduzidos em paralelo, para determinação da cinética de produção de biomassa por cultivo no estado sólido e análise respirométrica do fungo *A. brasiliensis*.

3.7.3.1 Determinação da umidade inicial e vazão de ar

Este experimento teve por objetivo verificar a melhor umidade inicial do substrato e da vazão de ar no sistema de aeração forçada para as colunas de Raimbault. Os parâmetros analisados e respectivos valores estão demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4 - Umidade inicial do substrato e da vazão de ar em colunas para *A. brasiliensis* LPB-03 cultivado em trigo.

Experimento	Umidade inicial do substrato (%)	Vazão de ar (mL.min ⁻¹)
1	34	10
2	34	30
3	34	50
4	39	10
5	39	30
6	39	50
7	44	10
8	44	30
9	44	50

Amostras foram retiradas antes e após o cultivo para determinação do pH, da umidade do substrato e Aw. Após 14 dias de incubação, o material cultivado de cada coluna foi retirado, misturado bem para homogeneização e armazenado a -20° C para dosagem do ergosterol. Todas as determinações foram realizadas em duplicata, e os valores expressam a média das análises.

3.7.3.2 Cinética da produção de biomassa

O sistema de cultivo em colunas com aeração forçada foi utilizado para determinação de parâmetros cinéticos de crescimento do fungo *A. brasiliensis* ao longo do tempo. Para o cultivo foram utilizadas as seguintes condições: umidade inicial do substrato de 39% e vazão de ar de 10 mL.min⁻¹. Amostras foram retiradas antes e após

o cultivo para determinação do pH, da umidade inicial do substrato e Aw. Colunas foram retiradas do sistema de cultivo nos tempos 0, 4, 18, 24, 36, 48, 72, 100, 196 e 302 horas para obtenção de amostras do material cultivado que foram armazenadas a – 20°C, para dosagem do ergosterol e posterior determinação da biomassa.

3.7.3.3 Análise respirométrica

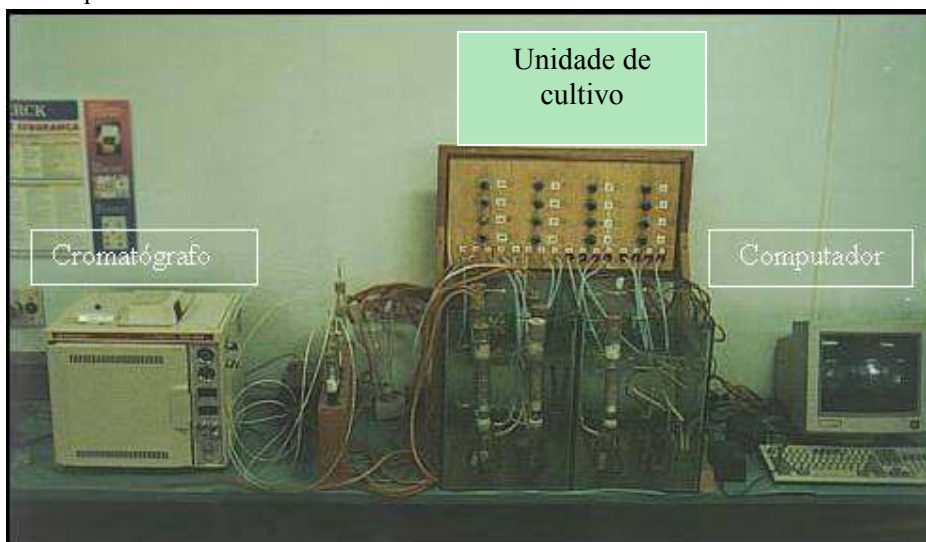
A análise respirométrica foi realizada em um sistema composto por bioreatores, nas mesmas condições e ao mesmo tempo do estudo de determinação de biomassa. Os gases que saíam de duas colunas foram desumidificados através da passagem por colunas de sílica-gel montadas em série, e analisados por cromatografia. Para isso, o sistema de cultivo foi acoplado a um cromatógrafo (Shimadzu-GC-8^A, Shimadzu Co., Japan), interfaceado ao programa Chroma (Biosystèmes, Ltda., France) instalado em um computador (Compaq-XT386) conforme pode ser visto na Figura 7. Os dados de taxa de consumo de oxigênio (TCO), CO₂ produzido e quociente de respiração (QR) obtido durante o processo foram analisados segundo o modelo matemático desenvolvido por RODRIGUEZ LEÓN *et al.*, (1988).

Os dados foram armazenados no programa Chroma, que é um integrador de cromatogramas. Ele recebeu os sinais analógicos do detector do cromatógrafo e os converteu em sinais numéricos. O cromatógrafo operou com um detector de condutividade térmica, um injetor automático e uma coluna Alltech CTR1. Esta coluna era concêntrica dupla, e consistia em uma parte externa formada de um filtro molecular de 5A° e a parte interna de uma mistura de polímeros porosos (Poropack 80/100). Esta coluna permitiu a separação de oxigênio, nitrogênio, ar, metano, dióxido e monóxido de carbono em diferentes tempos de retenção.

O cromatógrafo gasoso operou com temperatura de 60°C tanto para o detector como para a coluna. A fase gasosa utilizada foi o gás hélio com vazão de 30 mL.min⁻¹, pressão de 1 bar, corrente do catarômetro de 120 mA e o volume de injeção de 300 µL. O gás para calibração utilizado foi de (%): Ar - CO₂(0,0)/O₂(21,0)/N₂(79,0); a mistura 1 era constituída de CO₂(5,0)/O₂(5,0)/N₂(90,0) e a mistura 2 de

CO₂(10,0)/O₂(15,0)/N₂(75,0). Nestas condições o tempo de retenção (min) de cada componente foi expresso como 0,62 para o ar, 0,95 para CO₂, 5,72, para O₂ e 8,02 para N₂.

FIGURA 7 - Sistema de cultivo estático, cromatógrafo e computador utilizado na análise respirométrica.



3.7.3.4 Estimativa de produção da taxa de consumo de O₂ e produção de CO₂

Com a finalidade de estimar a taxa de consumo de oxigênio (TCO) e a evolução da produção de CO₂ em termos de vazão (L.h⁻¹), foi realizado um balanço de massa, desprezando-se a contribuição do vapor d'água. Este balanço foi estimado considerando-se um peso inicial de 45 g de matéria seca (MS); a vazão de gás de entrada (F_E) e a composição centesimal de O₂ e CO₂ na saída (F_S) do sistema de cultivo foi de 0,6 L.h⁻¹.(g MS)⁻¹. As seguintes equações foram consideradas:

$$V_{O_2S} = \left(\frac{\%O_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (1)$$

$$V_{CO_2S} = \left(\frac{\%CO_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (2)$$

$$F_S = V_{O_2S} + V_{CO_2S} + V_{N_2S} \quad (3)$$

$$V_{N_sS} = \left(\frac{100 - \%O_{2S} - \%CO_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (4)$$

onde:

V_{O_sS} = vazão de O_2 na saída

$\%O_{2S}$ = percentagem de O_2 na saída

$V_{CO_{2S}}$ = vazão de CO_2 na saída

$\%CO_{2S}$ = percentagem de CO_2 na saída

V_{N_sS} = vazão de N_2 na saída do biorreator.

Sabendo-se que :

$$V_{N_sE} = \frac{79}{100} \times F_E \quad (5)$$

$$V_{N_sE} = V_{N_sS} \quad (6)$$

onde:

V_{N_sE} = vazão de N_2 na entrada do reator;

chegou-se a seguinte equação que relaciona a vazão de gás de entrada e de saída:

$$F_E = \frac{(100 - \%O_{2S} - \%CO_{2S}) \times F_S}{79} \quad (7)$$

Para calcular a vazão volumétrica de O_2 consumido fez-se um balanço de massa para o oxigênio obtendo-se a equação:

$$V_{O_sCONS} = \left(\frac{21}{100} \right) \times F_E - \left(\frac{\%O_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (8)$$

onde:

V_{O_sCONS} = vazão de O_2 consumido.

Para estimar a taxa de consumo de O_2 e de produção de CO_2 , em $\mu\text{mol.h}^{-1}$, considerou-se o ar como gás ideal e as vazões volumétricas V_{O_sCONS} e V_{O_sS} .

3.7.3.5 Estimativa de produção de biomassa

O modelo de consumo de oxigênio durante o cultivo completo em um sistema aeróbico é um modelo global, que considera o consumo de O_2 para o crescimento e manutenção. A manutenção celular representa o metabolismo endógeno, sendo necessário realizar um balanço para o consumo de oxigênio (PANDEY *et al.*, 2001).

Em termos gerais e considerando um processo no qual somente a biomassa celular é produzida, e não metabólitos extracelulares, pode-se dizer que:

$$O_2 \text{ consumido} = (O_2 \text{ empregado na síntese da biomassa celular} + O_2 \text{ empregado na manutenção da biomassa celular}) \quad (9)$$

A taxa de consumo de oxigênio (TCO) em um processo é definida como:

$$R_{O_2CONS} = \frac{\Delta O_2}{\Delta t} \quad (10)$$

onde:

$$R_{O_2CONS} = O_2 \text{ consumido em um intervalo de tempo } \Delta t \text{ (gO}_2\text{.h}^{-1}\text{)}.$$

O oxigênio empregado na síntese da biomassa (O_{2SINT}) é obtido pela expressão

$$R_{O_2SINT} = \frac{\Delta O_{2SINT}}{\Delta t} = \frac{1}{Y_{X/O}} \times \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (11)$$

onde:

$$R_{O_2SINT} = O_2 \text{ empregado na síntese da biomassa celular (g O}_2\text{.h}^{-1}\text{)};$$

$$Y_{X/O} = \text{rendimento baseado no consumo de oxigênio para síntese da biomassa celular no intervalo de tempo considerado (g de biomassa. g O}_2^{-1}\text{)};$$

$$\Delta X = \text{biomassa sintetizada durante o intervalo de tempo considerado (g)};$$

$$\Delta t = \text{intervalo de tempo considerado (h)}.$$

O oxigênio empregado no processo endógeno é estimado pela expressão definida por Monod, na qual emprega-se o conceito de coeficiente de manutenção da biomassa celular (PANDEY *et al.*, 2001):

$$m_x = \frac{1}{X} \times \left(\frac{dS}{dt} \right)_{ENDOG} \quad (12)$$

onde:

m_x = coeficiente de manutenção da biomassa celular (g O₂ x g de biomassa⁻¹. h⁻¹);

X = biomassa celular em um tempo t (g).

Considerando-se o O₂ como substrato pode-se postular que:

$$R_{O_2 ENDOG} = \frac{\Delta O_{2 ENDOG}}{\Delta t} \quad (13)$$

onde:

$$R_{O_2 ENDOG} = O_2 \text{ consumido em um intervalo de tempo } \Delta t \text{ (gO}_2 \cdot \text{h}^{-1}\text{)}.$$

Relacionando as equações (9) e (13) obtém-se a seguinte expressão:

$$\frac{\Delta O_2}{\Delta t} = \frac{1}{Y_{X/O}} \times \frac{\Delta X}{\Delta t} + m_X X \quad (14)$$

A equação (14) permite estimar a quantidade de biomassa celular que existe em um tempo t de cultivo através de dados do consumo de oxigênio por determinações finitas do seu consumo em intervalos de tempo particulares. Integrando a equação (14) pode-se afirmar que :

$$\int_{t=0}^{t=n} R_{O_2 CONS} dt = \int_{t=0}^{t=n} \frac{1}{Y_{X/O}} \frac{dX}{dt} + \int_{t=0}^{t=n} m_X X dt \quad (15)$$

O termo $\int_{t=0}^{t=n} R_{O_2 CONS}$ na equação (15) indica que o oxigênio consumido em um tempo $t=n$ pode ser estimado entre TCO *versus* tempo. Uma solução para a equação (15) foi postulada por métodos numéricos. Aplicando a regra do trapézio para a integração numérica do primeiro termo na expressão tem-se que:

$$\int_{t=0}^{t=n} \frac{dO_2}{dt} \approx \frac{\Delta t}{2} \left\{ \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + 2 \left[\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=1} + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=2} + \dots + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n-1} \right] + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right\} \quad (16)$$

onde:

$$\left(\frac{dO_2}{dt}\right)_{t=i} = O_2 \text{ consumido no intervalo de tempo } i \text{ (gO}_2\text{.h}^{-1}\text{)};$$

Δt = intervalo de tempo considerado na estimativa (h).

Considerando constante o rendimento baseado no consumo de O_2 ($Y_{X/O} = k$) obtém-se:

$$\int_{t=0}^{t=n} \frac{1}{Y_{X/O}} dX = \frac{1}{Y_{X/O}} (X_n - X_0) \quad (17)$$

onde:

X_0 = biomassa no início do intervalo de tempo Δt (g);

X_n = biomassa no final do intervalo de tempo Δt (g).

O valor do último termo da expressão (15) é obtido usando o mesmo procedimento para a obtenção da expressão (16) e considerando o coeficiente de manutenção da biomassa celular constante ($m_x = k$):

$$\int_{t=0}^{t=n} m_X X dt \approx m_X \frac{\Delta t}{2} [X_{t=0} + 2(X_{t=1} + X_{t=2} + \dots + X_{t=n-1}) + X_{t=n}] \quad (18)$$

Relacionando as equações (15) e (18) obtém-se a equação:

$$X_n = \frac{Y_{X/O} \Delta t \left\{ \frac{1}{2} \left[\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right] + \sum_{i=1}^{i=n-1} \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=i} \right\} + \left(1 - \frac{a}{2} \right) X_0 - a \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i}{\left(1 + \frac{a}{2} \right)} \quad (19)$$

onde:

$$a = m_X Y_{X/O} \Delta t$$

A partir dos valores calculados para a taxa de consumo de O_2 e produção de CO_2 , foi feita uma estimativa dos parâmetros biotecnológicos. O procedimento para o cálculo da biomassa celular (X_n) em um dado tempo (t) consistiu em assumir valores para o rendimento de biomassa baseado no consumo de oxigênio ($Y_{X/O}$) e no coeficiente de manutenção da biomassa celular (m_X) pelo programa Fersol (RODRIGUES-LEÓN *et al.*, 1988).

Foram considerados nove valores de biomassa fúngica determinados analiticamente nos tempos de 04, 18, 24, 36, 48, 72, 100, 196 e 302 horas de cultivo. O programa permitiu determinar os coeficientes da equação por aproximação sucessiva. A partir dos valores da taxa de consumo de O₂ e produção de CO₂, obtidos experimentalmente, o sistema determinou um rendimento de biomassa celular ($Y_{X/O}$).

3.7.3.6 Extração e dosagem do ergosterol

A extração e dosagem do ergosterol foram realizadas baseadas no método descrito por CARVALHO *et al.*, (2006), com pequenas modificações. Após o descongelamento, 0,5 g de biomassa produzida por cultivo submerso ou um (1) g de material cultivado no estado sólido foram pesados, colocados em frascos de vidro, adicionados 2 mL de etanol P.A e 1 mL de NaOH 2M. Os frascos foram tampados, e após agitação manual por 1 min e incubação por 1 h a 70° C com agitação periódica, adicionou-se 2 mL de ácido clorídrico 1M. Procedeu-se a agitação, adição de 1 mL de KHCO₃ 1M e 2 mL de n-hexano e nova agitação. Transferiu-se a mistura para tubos de ensaios, e centrifugou-se por 5 min para separação das fases leve e pesada. Recolheu-se a fase leve (n-hexano) e repetiu-se a extração mais duas vezes com 2 mL e 1 mL de n-hexano. O extrato na fase orgânica foi filtrado em membrana 0,22 µm (GS em éster de celulose -Millipore), evaporado a vácuo (VacuCell- MMM) a 200 mmHG a 35°C e ressuspenso em 200 µL de n-hexano.

A análise dos extratos foi realizada em HPLC Varian ProStar, com coluna C18 e detector PDA (matriz de fotodiodos) regulado a 282 nm. As condições de eluição do analito foram baseadas em pesquisas anteriores (MONTGOMERY *et al.*, 2000; GONG *et al.*, 2001; MATILLA *et al.*, 2002; LINDBLOM; WACHENFELDT; TRANVIK, 2004; ZHAO; LIN; BROOKES, 2005). O volume de injeção foi de 20 µL da amostra. A fase móvel utilizada foi metanol puro (de 0 a 3 min), acetonitrila pura (3 a 10 min) e metanol puro (de 10 a 15 min) com vazão de 2 mL.min⁻¹. O tempo de retenção do ergosterol foi observada a 3,35 min. Como amostra padrão foi utilizada uma solução de ergosterol (P.A.) a 10000 µg.mL⁻¹, com diluições a 50000 e 10000

$\mu\text{g.mL}^{-1}$. Como amostra para a linha base utilizou-se 10 mL de hexano puro. O resultado da concentração de ergosterol nas amostras foi plotada em picos para obtenção das respectivas áreas, calculado no próprio equipamento do HPLC.

Com a finalidade de estimar a porcentagem de recuperação do ergosterol, uma amostra de material cultivado foi dopada com 2000 μg de ergosterol e procedeu-se à extração. O mesmo procedimento foi realizado em paralelo com a mesma amostra, porém sem a adição do padrão de ergosterol. A diferença dos resultados foi considerada a porcentagem de recuperação.

3.7.4 Cultivo em frascos e bandeja em substrato sólido

Após a inoculação, conforme descrição no item 3.7.3, os frascos e bandejas foram incubados durante um período de 18 dias (± 2), sob ausência de luz na Câmara de cultivo e fermentação no LPB-I. Utilizou-se aquecedor e umidificador (Climaterra) para controle de temperatura a 30°C e de umidade variando entre 96% ($\pm 2\%$) no ambiente. A umidade do ar foi mensurada com auxílio de um higrômetro (Labcraft).

O material cultivado foi seco a temperatura de 55°C em estufa com circulação de ar (Digimec) durante 24 h. Em seguida o material seco foi moído em moinho de facas (DeLeo), peneirado em agitador de peneiras (Bertel) para obtenção da fração com granulometria $< 2\text{ mm}$ e armazenado sob temperatura ambiente até o preparo da ração.

3.8 PREPARO DA RAÇÃO

O Experimento I foi realizado com a ração cultivada em grãos de trigo, ou seja, os grãos de trigo totalmente colonizados pelo micélio de *A. brasiliensis*. Os Experimentos II e III foram feitos com ração cultivada em trigo do tipo “para quibe”.

Os aspectos do substrato durante sua manipulação até obtenção da ração estão demonstrados na Figura 8. Amostras deste material cultivado foram utilizadas para análises da composição centesimal segundo normas da AAOC, 1998.

A ração foi formulada com o objetivo de obter uma ração com composição centesimal semelhante ao da ração comercial (marca Nuvilab) utilizada no Biotério da

UFPR (Tabela 5). Para fins de cálculo foram utilizados dados da composição centesimal do trigo *in natura* e do trigo cultivado expressos na Tabela 5 e Tabela 9, respectivamente, descrito no item 4.1.

FIGURA 8 - Etapas de preparo do trigo até obtenção da ração.



NOTA: 1) trigo *in natura*; 2) trigo umedecido durante 12 h; 3) trigo cultivado por *A. brasiliensis*; 4) material cultivado após secagem; 5) material cultivado moído e peneirado com granulometria < 2mm; 6) ração formulada.

TABELA 5 - Composição centesimal de ração comercial e do trigo *in natura* utilizado como base para formulação da ração.

	Ração comercial (%)*	Trigo <i>in natura</i> (%)**
Umidade	12,5	12
Proteína bruta	22	11
Extrato etéreo	4	2
Material mineral	10	2
Matéria fibrosa	8	13

FONTE: * Nuvital, 2004; **Franco (1999).

A ração básica foi formulada com suplementação de proteína na forma de albumina, de lipídeo com adição de óleo de soja, e água destilada, a fim de se obter uma dieta equilibrada segundo Dieta AIN-93 - American Institute of Nutrition

(REEVES; NEILSEN; FAHEY, 1993). Usou-se a seguinte proporção para a formulação da ração: 950 g de trigo cultivado, 50 g de clara em pó, 22 mL de óleo de soja e 150 mL de água destilada. A ração formulada apenas com trigo não cultivado foi feita com a seguinte formulação: 853 g de trigo cultivado, 147 g de clara em pó, 22 mL de óleo de soja e 150 mL de água destilada.

As rações foram preparadas semanalmente e armazenadas a 4°C até o momento de sua utilização. Os camundongos receberam ainda a administração de solução polivitamínica durante o período do Experimento I, com a seguinte composição básica: palmitato de retinol, tocoferol, colicalciferol, cloridrato de tiamina, riboflavina, cloridrato de piridoxina, cianocobalamina, ácido ascórbico, nicotinamida, bitartarato de colina, pantotenato de cálcio, Sacarose, estabilizante, antioxidante e fungicida. As concentrações da solução polivitamínica estão expressas na Tabela 6.

TABELA 6 - Composição de solução polivitamínica utilizada como suplemento para os camundongos durante o período do experimento.

Nutriente	Concentração (100 mL)
Vitamina A	250.000 UI
Vitamina E	600 mg
Vitamina B1	200 mg
Vitamina B2	160 mg
Vitamina B6	160 mg
Vitamina B12	260 mcg
Vitamina C	1320 mg
Niacina	1320 mg
Colina	4000 mg
Pantotenato de cálcio	660 mg

FONTE: Labcon, 2004.

3.9 EXPERIMENTOS *IN VIVO* COM CAMUNDONGOS

O procedimento experimental, com material biológico e animais foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, Projeto nº 70 (ANEXO I).

3.9.1 Animais, grupos, tipos de rações e procedimentos

Os Experimentos I e II foram realizados com camundongos albinos suíços (*Mus musculus*), fêmeas, saudáveis, com 30 a 35 dias de idade, pesando entre 17 e 24 g. O

Experimento III foi realizado com camundongos albinos suíços machos (*Mus musculus*), machos, saudáveis, com 60 dias, pesando entre 27 e 32 g. O uso de animais fêmeas ou machos não implica em alterações nos resultados dos estudos destes experimentos. Os animais foram mantidos no Biotério, com fotoperíodo controlado (ciclo claro escuro 12/12 horas) e temperatura constante ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). A ração foi fornecida em formas pequenas (Figura 9) a cada dois a três dias, com água *ad libitum*, e monitoramento semanal do peso, utilizando balança digital (Denver XL 4-1). A divisão dos grupos e tipos de rações está descrita no Quadro 1.

FIGURA 9 - Camundongos alimentados com a ração formulada para os experimentos. À direita, detalhe da forma contendo ração.



Três tipos de rações foram preparados, em função do Experimento I: A100, A50 e Controle. A ração básica foi preparada com 100% de trigo cultivado, suplementada com proteína, lipídeo e água destilada e denominada de A100. A ração tipo Controle, designada por C, foi formulada com trigo *in natura*, e submetida às mesmas etapas de preparo do material cultivado, exceto as fases de inoculação e cultivo. A ração designada de A50 foi formulada pela mistura de 50% de ração tipo Controle e 50% de ração do tipo A100.

Para a execução do Experimento II foram preparados quatro tipos de rações: A10, A10Lip, Controle e Controle Lip. A ração designada de A10 foi obtida pela mistura de 90% de ração do tipo comercial e 10% de ração cultivada a base de trigo para quibe. A ração denominada de A10Lip foi formulada com ração A10 e adição de

5% de lipídeos saturados, na forma de banha de porco, adquirida no mercado local. Os grupos Controles do experimento II receberam ração do tipo industrial (Nuvilab) moída, sendo que um dos grupos (CLip) recebeu esta ração com suplementação de 5% de lipídeos.

QUADRO 1 - Grupos e tipos de rações utilizados nos Experimentos I, II e III..

Experimento I		Cultivo em trigo integral					
Grupos (n=10)		A100	A100-S	A50	A50-S	C	C-S
Inoculação na 10ª semana	solução salina	X		X		X	
	S-180		X		X		X
Tipo de ração		Ração básica: formulada à base de <i>A. brasiliensis</i>		50% ração básica + 50% ração controle		Ração controle: formulada à base de trigo integral	
Experimento II		Cultivo em trigo tipo “para quibe”					
Grupos (n=7)	A10	A10-lip		C-a	C-b	C-lip	
Tipo de ração	10% Ração básica: formulada à base de <i>A. brasiliensis</i> +90% Ração comercial	10% Ração básica: formulada à base de <i>A. brasiliensis</i> +85% Ração comercial +5% lipídeos		100% ração comercial		95% ração comercial +5% lipídeos	
Experimento III		Cultivo em trigo tipo “para quibe”					
Grupos (n=9)		A10-S			C-S		
Inoculação na 9ª semana	S-180	X			X		
Tipo de ração		10% Ração básica: formulada à base de <i>A. brasiliensis</i> +90% Ração comercial			100% ração comercial		

Nota: grupos A100, A50 e A10: *Agaricus* 100, *Agaricus* 50 e *Agaricus* 10, respectivamente; C, C-a e C-b: grupos controle; grupos A100S, A50S e A10S: *Agaricus* 100 S-180, *Agaricus* 50 S-180 e *Agaricus* 10 S-180, respectivamente; C-S: grupo controle S-180, A10-lip: grupo *Agaricus* 10 lipídico; C-lip: grupo controle lipídico; S-180: Sarcoma 180.

Os procedimentos e análises utilizados nos Experimentos I, II e III estão sumarizados no Quadro 2. O Experimento I teve duração de 14 semanas e foi realizado com 60 animais que foram divididos em três grupos de 20 indivíduos, e 10 camundongos em cada gaiola (de polipropileno, medindo 30 x 45 x 20 cm). O tratamento dos grupos consistiu na alimentação suplementada com o cogumelo *A.*

brasiliensis. As rações utilizadas foram formuladas conforme descrição no item 3.8, originando as seguintes designações para os grupos: A100, A50 e C - Controle. Em função da inoculação de S 180 em metade dos animais de cada grupo na 10ª semana, a denominação destes grupos foi A100-S, A50-S e C-S.

QUADRO 2 - Procedimentos e análises utilizados nos Experimentos I, II e III.

Numero do experimento		I						II					III	
Duração (semanas)		14						11					9	
Grupos		A100	A100 -S	A50	A50-S	C	C-S	A10	A10-Lip	C-a	C-b	C-Lip	C-S	A10-S
Ingestão de água entre 4ª a 9ª semana	Quantidade (mL)	X	X	X	X	X	X							
Alimentação a base da ração	Pesagem semanal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta de urina (9ª semana)	Parcial de urina	X	X	X	X	X	X							
Coleta de fezes (9ª semana)	Parasitológico, sangue oculto e de gordura fecal	X	X	X	X	X	X							
Inoculação de sol. salina		X		X		X								
Inoculação de Sarcoma 180	Redução tumoral		X		X		X						X	X
Coleta de sangue (final do experimento)	Glicemia manual	X	X	X	X	X	X							
Separação do plasma	Parâmetros bioquímicos e imunológicos: interleucinas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Retirada de tumor	Pesagem medida		X		X		X						X	X
Retirada de linfonodos axilares	Marcação de células e leitura no FAC-S	X	X	X	X	X	X						X	X
Retirada de baço	Marcação de células e leitura no FAC-S	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Nota: grupos A100, A50 e A10: Agaricus 100, Agaricus 50 e Agaricus 10, respectivamente; C, C-a e C-b: grupos controle; grupos A100S, A50S e A10S: Agaricus 100 S-180, Agaricus 50 S-180 e Agaricus 10 S-180, respectivamente; C-S: grupo controle S-180, A10-lip: grupo Agaricus 10 lipídico; C-lip: grupo controle lipídico; S-180: Sarcoma 180.

O Experimento II teve duração de 12 semanas, realizado com 35 animais divididos em cinco grupos, com sete camundongos cada. Os grupos receberam os nomes em função do tipo de ração recebida: A10, A10lip, dois grupos Controle: a e b, e um grupo Controle Lip. A denominação “Lip” se refere à suplementação da respectiva ração com 5% de lipídeos saturados, na forma de banha de porco.

O Experimento III teve duração de 11 semanas, realizado com 18 animais, divididos em dois grupos, com nove camundongos cada e que receberam a seguinte denominação: A10-S e C-S, em função dos tratamentos recebidos. O grupo A10-S recebeu a ração do tipo A10 e o grupo C recebeu ração industrial moída. Estes dois grupos foram inoculados com suspensão de células de Sarcoma 180 na 9ª semana do experimento.

3.9.2 Manutenção da linhagem de Sarcoma 180 *in vivo*

O modelo tumoral utilizado foi o Sarcoma 180 (S-180). Suas células têm crescimento lento e não se metastatizam para outros órgãos (KURASHIME e MITSUHASHI, 1982). Este tumor foi encontrado na região axilar de camundongo albino macho e foi utilizado apenas como sarcoma sólido até 1952, quando GOLDIE e colaboradores o transformaram em tipo ascítico. A partir de então é muito usado para testes anti-tumorais em diferentes laboratórios por ser de fácil manutenção em animais de biotério (ZUCKERBERG, 1972; SHIRAI *et al.*, 1991).

A linhagem de S-180 foi cedida gentilmente pela Dra Andréa N. Moreno (CCB, PUC-PR) para execução do Experimento I, e pela MSc. Márcia Luciane Lange Silveira Silva (UNIVILLE – Joinville - SC) para o Experimento III. A linhagem foi mantida por repiques intraperitoneais (i.p.) e semanais até o momento da inoculação do Sarcoma. Os animais portadores do S 180 ascítico com sete dias foram mortos por inalação excessiva de éter etílico e o líquido ascítico contendo as células tumorais foi aspirado e centrifugado (1500 rpm, 5 min). Uma alíquota da suspensão celular foi corada com corante vital azul de tripan a 0,4% p.v⁻¹ em PBS (Phosphate-Buffered Saline – tampão fosfato salina), para contagem em câmara de Neubauer, em

microscópio de luz. A viabilidade celular foi calculada em função da equação 20 (PHILLIPS, 1973):

$$CV(\%) = 100 \left(\frac{NC}{NC + C} \right) \quad (20)$$

Onde:

CV = células viáveis;

NC = células não coradas,

C = células coradas pelo azul de tripan.

A concentração das células da suspensão celular foi ajustada a 10^6 células viáveis .mL⁻¹ com PBS estéril. Cada animal foi inoculado intraperitoneal com 1 mL desta suspensão.

3.9.3 Implantação do tumor sólido

Sete dias após a inoculação i.p de células do S-180, utilizando-se o procedimento descrito em 3.9.2, obteve-se uma suspensão celular de 5×10^7 células viáveis.mL⁻¹. Desta suspensão 0,2 mL foi inoculado via subcutânea (s.c.) no lado direito da região interescapular de cada camundongo dos grupos A100-S, A50-S, C-S do Experimento I e A10-S, C-S do Experimento II, para desenvolvimento do tumor sólido (SHIRAI *et al.*, 1991). As células tumorais foram inoculadas nos animais após 10 e cinco semanas de alimentação suplementada com o cogumelo, no Experimento I e II, respectivamente. Os animais dos grupos A100, A50, e C foram inoculados com 0,2 mL de solução salina estéril, do mesmo modo que para os camundongos com S-180.

3.9.4 Ingestão de água e coleta de urina e de fezes

Durante o Experimento I foi monitorado a ingestão de água em intervalos de 24 horas, durante 21 dias, entre a quarta e nona semana de alimentação.

Durante a nona semana do Experimento I, os animais foram acondicionados, por grupo, durante um período de 15 horas em gaiolas metabólicas para coleta de urina e de fezes, material obtido por excreção voluntária, conforme pode ser visualizado na Figura 10. Durante este tempo, os camundongos não receberam alimento, apenas água *ad libidum*. O material coletado foi utilizado para análise parcial: volume de urina

excretado (por grupo de animais, tendo em vista o reduzido volume excretado por animal), cor, aspecto, pH, densidade, proteínas, glicose, bilirrubinas, urobilinogênio, corpos cetônicos e nitritos na urina. Estas análises foram efetuadas no Hospital das Clínicas, (HC) da UFPR, utilizando-se fitas reagentes Combur 10 e o equipamento Meditron Junior Boheringer. Os sedimentos urinários como presença de cristais, cilindros e células (eritrócitos, leucócitos e células epiteliais) foram analisados por microscopia. Os exames: parasitológico, de sangue oculto e de gordura fecal foram realizados nas fezes, por microscopia, no HC.

FIGURA 10 - Camundongos na gaiola metabólica, para coleta de urina e fezes.



3.9.5 Coleta de sangue

Ao final do período dos experimentos, os camundongos foram sedados com éter etílico por inalação e o sangue coletado por punção cardíaca, com uso de seringas umedecidas com heparina. Uma gota do sangue de cada camundongo foi utilizada para medir a glicemia por meio de medidor de glicose manual (Sistema Completo One Touch Ultra J&J). As amostras de sangue foram coletadas individualmente em tubos e o plasma separado após centrifugação (3.500 rpm por 15 min) e acondicionado em dois tubos criogênicos e congelado a -80°C para posteriores análises bioquímicas e imunológicas. Antes do congelamento, partes do plasma foram utilizadas para mensuração das concentrações de glicose, lipídeos totais, colesterol, HDL_{Dy2}, TAG,

proteínas totais, albumina, globulina, TGO, TGP, uréia, creatinina, ácido úrico, por ensaio automático com ADVIA 1650 Bayer no HC. Além disso, quando as amostras foram descongeladas para análise de interleucinas, foram realizadas novas análises das concentrações plasmáticas de colesterol total, TAG e de HDL com uso de ensaio da Diagnostica, Labteste.

3.9.6 Análise do tamanho dos tumores e atividade antitumoral

Após 30 dias da inoculação das células tumorais, os animais foram mortos por inalação de éter etílico. Os tumores dos animais dos grupos A100-S, A50-S e C-S do Experimento I, e dos grupos A10-S e C-S do Experimento III foram retirados, pesados em balança analítica (Marte) e medidos com uso de régua para verificar seu tamanho (mm^2). Os dados obtidos foram utilizados para cálculo da redução tumoral e volume do tumor, conforme as equações 21 e 22, respectivamente, segundo ITO *et al.*, (1997), baseado em U.S. NATIONAL CANCER RESEARCH, (1984).

$$I (\%) = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100 \quad (21)$$

Onde:

I = redução tumoral (%);

T = média do tamanho do tumor no grupo tratado (mm);

C = média do tamanho do tumor no grupo controle (mm).

O tamanho do tumor por sua vez, foi calculado segundo a equação 22:

$$C = \frac{4}{3} \pi a^2 \frac{b}{2} \quad (22)$$

Onde:

C = média do tamanho do tumor no grupo controle (mm);

a = diâmetro menor do tumor (mm);

b = diâmetro maior do tumor (mm).

A análise da redução tumoral baseada no peso dos tumores foi feita segundo a fórmula expressa pela equação 23:

$$I (\%) = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100 \quad (23)$$

Onde:

I = redução tumoral (%);

T = média do peso do tumor no grupo tratado (mm);

C = média do peso do tumor no grupo controle (mm).

3.9.7 Coleta de órgãos

Após pesagem das carcaças, procedeu-se a retirada dos linfonodos axilares e do baço, os quais foram acondicionados em placas de Petri com 2 mL de PBS para posterior processamento e marcação das células.

3.9.8 Processamento dos órgãos

A fim de obter o número ideal de células para leitura no Citômetro de Fluxo, os órgãos dos camundongos foram reunidos em “pool” para o processamento. No Experimento I se obteve quatro amostras de linfonodos para os grupos com S-180, e duas amostras para os grupos sem sarcoma. Para o baço, foram obtidas quatro amostras de todos os grupos. No Experimento II, foram obtidas três amostras de baços para cada grupo. As análises foram realizadas em duplicata.

Os órgãos foram processados segundo metodologia descrita em COLIGAN *et al.*, (2002). Os órgãos foram macerados em PBS, manualmente, com uso de êmbolo de seringa a fim de separar a cápsula das células. Este material foi filtrado, centrifugado a 900 g por 10 min, com descarte do sobrenadante. Quando necessário, como para o baço, foi adicionado solução de lise, e procedeu-se à nova centrifugação, com posterior descarte do sobrenadante. Após duas lavagens com PBS e tampão azida e novas centrifugações, o *pellet* de células foi ressuspensão em 2 mL de tampão azida e foi realizada a contagem em hemocitômetro. A suspensão de células foi diluída a uma concentração de 10^7 céls.mL⁻¹, para posterior marcação.

3.9.9 Marcação de células

Após a diluição, a suspensão celular foi aliquoteada em tubos Eppendorf e em seguida recebeu a suspensão de cada anticorpo (ac), de modo a se obter 0,5 µl de ac + 1×10^6 céls.ml⁻¹ + 100 µl de PBS. Após incubação por 20 min a 4° C, no escuro, usou-se PBS para lavagem do excesso de anticorpos, e adicionou-se PBS com paraformaldeído a 2% (m.vol⁻¹) para fixação das células.

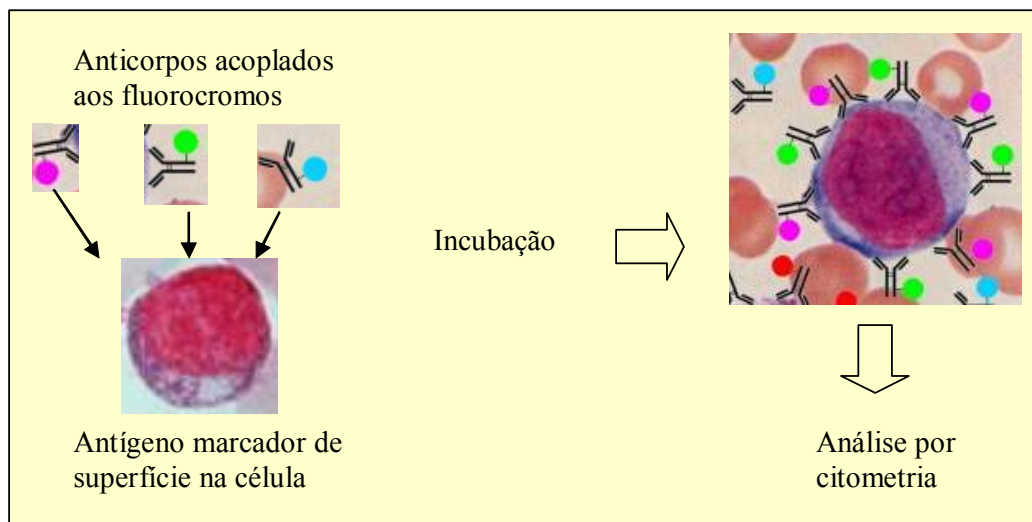
Os anticorpos fluorescentes monoclonais pré-tratados diretamente conjugados com “Fluorescein Isothiocyanate” - FITC ou “Phycoerytrin” –PE utilizados no experimento, seus clones e respectivas células secretoras estão descritos na Tabela 7. Um modelo esquemático da formação do complexo antígeno-anticorpo-fluorocromo pode ser observado na Figura 11.

TABELA 7 - Características dos anticorpos fluorescentes monoclonais utilizados nos experimentos com camundongos.

Anticorpos	Clone	Conjugado com	Expresso por células:
CD3	17A2	FITC	Timócitos e células T maduras
CD4	H129.19	PE	Linfócitos T “helper”
CD8a	53-6.7	PE	Linfócitos T supressores e citotóxicos
CD16/32	2.4G2	PE	“Natural killer”, monócitos, macrófagos, dendríticas, de Kupfer, granulócitos, linfócitos B, timócitos imaturos, alguns linfócitos T maduros.
CD19	1D3	PE	Células B em desenvolvimento: da fase de células pró-B até células B maduras.
CD25	7D4	FITC	Linfócitos T e B ativados

No Experimento I as células de linfonodos e de baço foram marcadas com os seguintes anticorpos: CD3⁺; CD4⁺; CD8⁺; CD16⁺/CD32⁺; CD19⁺; CD3⁺/CD4⁺; CD3⁺/CD8⁺; CD25⁺/CD4⁺ e CD25⁺/CD8⁺. No Experimento II, a marcação das células de baço foi feita com os anticorpos CD3⁺; CD4⁺; CD8⁺ e CD19⁺. Para o Experimento III, as células de baço e de linfonodos foram marcadas com os anticorpos CD3⁺; CD4⁺; CD8⁺ e CD19⁺.

FIGURA 11 - Modelo esquemático de formação do complexo antígeno-anticorpo-fluorocromo formado durante a marcação das células para análise por citometria de fluxo.



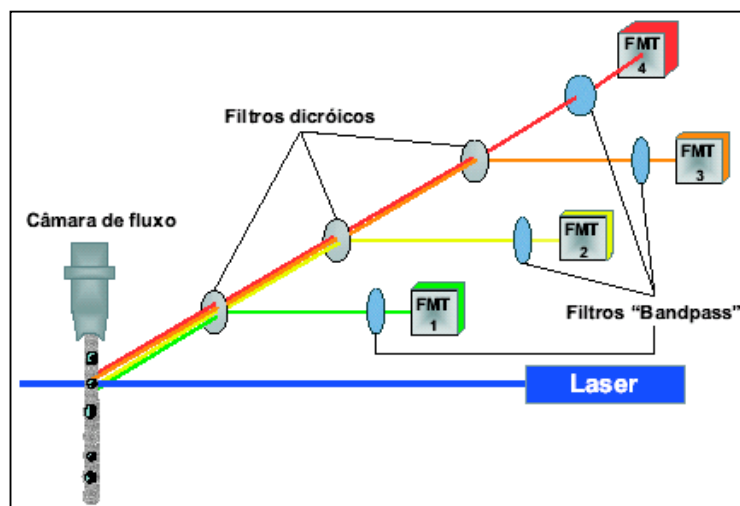
FONTE: adaptado de HMDS, 2006; MCL, 2006.

3.9.10 Leitura no Citômetro de Fluxo

A leitura das células foi realizada em citômetro de fluxo (Becton Dickinson FAC-Scalibur) até no máximo cinco dias após a marcação das células. O citômetro de fluxo é um equipamento de análise celular multiparamétrica, onde um número elevado de células em suspensão e marcadas com um fluorocromo passa em fila única por uma câmara de fluxo onde incide uma luz de laser (Figura 12). Na interseção da célula com o laser, esta provoca uma dispersão e uma emissão de fluorescência, cuja intensidade depende das características da célula, e que passa por filtros e lentes e é então reconhecida por detectores.

O equipamento (Figura 13) mede dois tipos de dispersões: a dispersão frontal, chamada de "Forward Scatter" – FSC, que é interpretada como uma medida do tamanho relativo e a dispersão ortogonal ou lateral, denominada de "Side Scatter" – SSC e que representa uma medida da complexidade relativa interna da célula analisada.

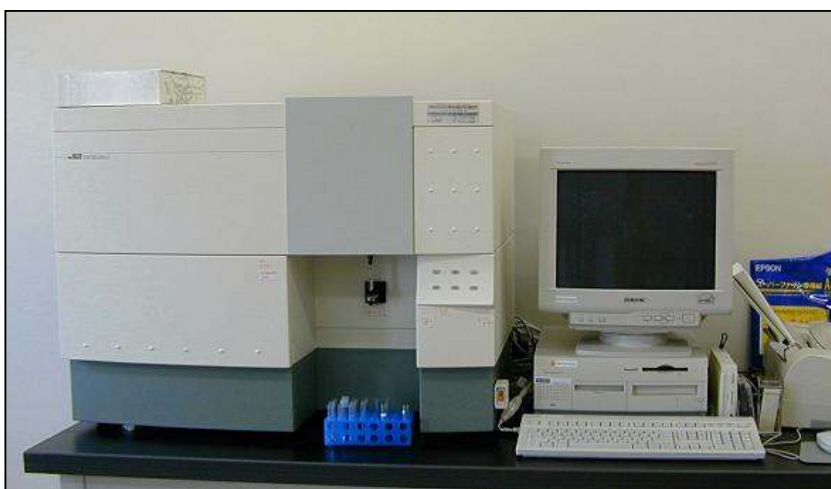
FIGURA 12 - Representação esquemática do funcionamento de citômetro de fluxo.



FONTE: adaptada de Purdue University Cytometry Laboratories, 2006.

O citômetro possui fotomultiplicadores (FMT), um para dispersão lateral e outros para as fluorescências. Os fluorocromos emitem cores variadas de fluorescência, assim, se é a Fluoresceína Isothiocianato - FITC que está acoplado ao complexo antígeno-anticorpo, será emitida a luz vermelha. Já o fluorocromo Ficoeritrina-PE emite a luz verde.

FIGURA 13 - Citômetro de fluxo FaC-Scalibur, semelhante ao utilizado para a leitura das células.

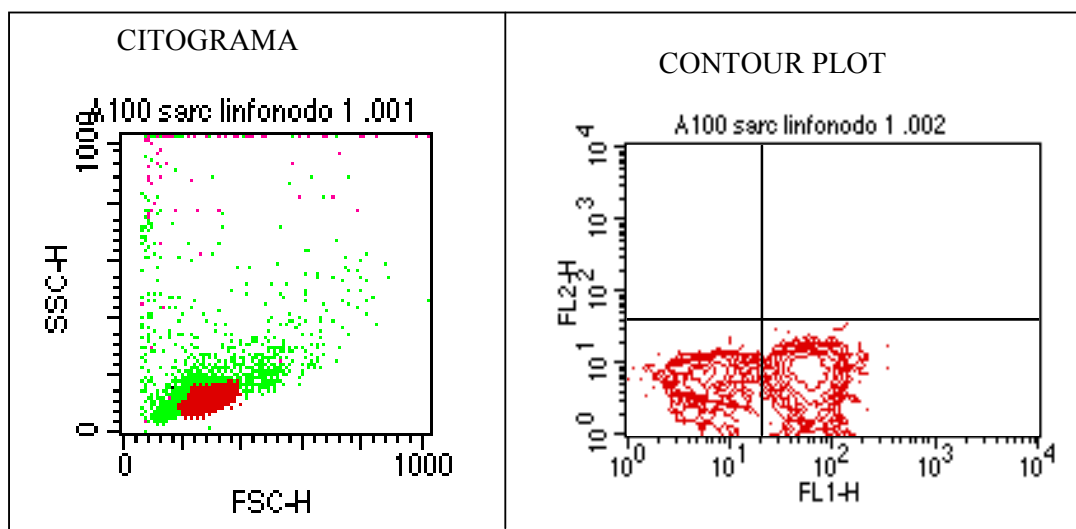


FONTE: Akita, 2005.

Estes sinais luminosos são amplificados e convertidos em pulsos eletrônicos pelos detectores, medidos e então sofrem uma conversão analógico-digital. Os sinais digitalizados são processados por analisadores em vários canais (FL1, FL2, FL3), de tal modo que é possível ir acumulando os sinais em tempo real, sob a forma de citogramas e diversos tipos de gráficos, que são visualizados no monitor do computador e, portanto verificando simultaneamente, as distribuições dos valores da frequência e/ou intensidade, de cada parâmetro celular. Desta forma, no canal FL1 é possível visualizar as células marcadas com PE, com fluorescência verde e no canal FL2 as células marcadas com FITC, de fluorescência vermelha.

Na Figura 14 observa-se o resultado adquirido no citômetro na forma de citograma, onde aparecem diversas populações de células e é possível distinguir a população de linfócitos marcados positivamente para CD3, em função do seu tamanho - FSC, e granulosidade - SSC.

FIGURA 14 - Citograma e gráfico do tipo “Contour plot” obtidos na leitura das células marcadas com FITC-CD3, de linfonodos do grupo A100 inoculados com Sarcoma 180.



NOTA: No citograma é possível observar a população de linfócitos em vermelho, dentro de um gate e as demais populações de células em verde. No gráfico Contour Plot é possível visualizar a fluorescência dos linfócitos CD3⁺ no quadrante embaixo à direita (LR), e a fluorescência natural destas células no quadrante embaixo à esquerda (LL).

Após a detecção de células CD3⁺, é possível desenhar um “gate” ao redor da população de interesse, de forma que estas células aparecem com uma cor diferente

das demais populações. Além disso, é possível visualizar no gráfico do tipo “Contour Plot” a fluorescência dos linfócitos CD3⁺ no quadrante embaixo à direita (LR), e a fluorescência natural destas células no quadrante embaixo à esquerda (LL).

Nos experimentos foram efetuadas contagens de 10.000 eventos ou células para cada amostra de células marcadas. Os resultados apresentados são a média das leituras das amostras.

A partir dos dados adquiridos, o próprio equipamento realizou os cálculos dos quadrantes da população de interesse (Figura 15). Com estes dados foi feita então a análise estatística conforme descrito no item 3.13.

FIGURA 15 - Estatística dos quadrantes dos dados da amostra de células marcadas com CD3, de linfonodos do grupo A100 inoculados com Sarcoma 180.

Quadrant Statistics								
File: A100 sarc linfonodo 1 .002					Log Data Units: Linear Values			
Sample ID:					Patient ID:			
Tube:					Panel:			
Acquisition Date: 22-Aug-04					Gate: G1			
Gated Events: 6076					Total Events: 10000			
X Parameter: FL1-H (Log)					Y Parameter: FL2-H (Log)			
Quad Location: 20, 39								
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***	***
UR	0	0.00	0.00	***	***	***	***	***
LL	1265	20.82	12.65	6.70	6.16	6.41	5.86	
LR	4811	79.18	48.11	64.74	61.18	7.21	6.21	

3.9.11 Análise de citocinas

A concentração das seguintes citocinas: IL 12 p 70; TNF; IFN- γ ; MCP-1; IL-10 e IL-6 foi determinada no plasma dos animais dos grupos A100, A100-S, A50; A50-S, C, C-S, A10, A10LIP e C e também no sobrenadante da cultura dos macrófagos cultivados *in vitro*. As citocinas foram determinadas em citômetro de fluxo (Becton Dickinson FAC-Scalibur) com uso do software CELL Quest (BD Biosciences). Os resultados foram expressos como pg.mL⁻¹ e representam a média de duas análises.

3.9.12 Cultivo de macrófagos

A partir dos animais dos grupos do experimento II foi realizada a retirada de macrófagos residentes peritoneais, que foram cultivadas *in vitro* para avaliação da fagocitose, volume lisossomal, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido; ainda foi analisada a concentração de óxido nítrico com e sem adição de LPS; para comparação entre os camundongos dos grupos A10, A10LIP, C e CLIP.

3.9.12.1 Isolamento de macrófagos

Após a coleta de sangue por punção cardíaca (descrita no item 3.9.6), inoculou-se 5 mL de PBS estéril no peritônio de cada animal, realizou-se suave massagem para desprendimento dos macrófagos peritoneais, que foram coletados com auxílio de seringa e imediatamente acondicionados em tubo Falcon. A fim de se obter o número mínimo de macrófagos necessários para as análises, foi feito um “pool” do lavado peritoneal de cada 5 animais do mesmo grupo. Após centrifugação (290 g, 4° C por 5 min) os macrófagos foram lavados e resuspensores em PBS ou em meio RPMI e contados em câmara de Neubauer em microscópio óptico usando solução de azul de Tripán para verificação da viabilidade das células. Os macrófagos foram então isolados por incubação em placas de cultivo celular por duas h e então lavadas três vezes com PBS para remoção das células não aderentes (PIZATO *et al.*, 2004).

3.9.12.2 Fagocitose

Alíquotas (0,1 mL) da suspensão de macrófagos foram adicionadas aos poços de placas de cultivo celular de fundo chato de 96 poços e deixados por 60 min para aderência das células. Em seguida 10 µl de zymosan fixadas em vermelho neutro (1×10^8 partículas.mL⁻¹) foram adicionados a cada poço. Após incubação por 30 min, as células foram fixadas com solução de cálcio-formol de Baker (4% formaldeído, 2% sódio clorídrico, 1% acetato de cálcio) em cada poço. Após 30 min, foi realizada a leitura da placa em leitor de placas em absorbância de 550 nm. A fagocitose foi

calculada a partir da curva-padrão feita com quantidades conhecidas de partículas de zymosan fixadas e os resultados foram expressos per mg proteína (BONATTO *et al.*, 2004).

3.9.12.3 Volume lisossomal

O volume do sistema lisossomal dos macrófagos foi determinado segundo absorção do corante catiônico vermelho neutro, que se concentra nos lisossomos das células. Inicialmente, 0,1 mL da suspensão de macrófagos foram distribuídos por poço da placa de cultivo e adicionou-se 20 µl do corante vermelho neutro a 3% em PBS em cada, e incubou-se por 30 min. As células foram então lavadas com PBS por centrifugação (453 g por 5 min). O vermelho-neutro foi solubilizado por incubação durante 30 min com adição de 0,1 mL de ácido acético a 10% adicionado de solução de etanol a 40%. A absorbância foi lida em 550 nm e a ingestão do vermelho-neutro foi calculada por mg de proteína (PIPE *et al.*, 1995).

3.9.12.3 Peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais foi mensurada conforme está descrito PICK e MIZEL (1981). O ensaio é baseado na conversão dependente da peroxidase horseradish (HRPO) do vermelho fenol em um composto colorido pelo H_2O_2 . Macrófagos (volume final de 0,1 mL) foram incubados na presença de glicose (5 mM), de solução de vermelho fenol (0,56 mM) e de HRPO ($8,5 \text{ U.mL}^{-1}$) no escuro por 1 h a 20 °C. Depois deste período, a absorbância foi medida em 620 nm em um leitor de placas. A concentração de H_2O_2 foi determinada a partir de uma curva-padrão preparada em paralelo. A produção de H_2O_2 foi expressa como $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ proteína.

3.9.12.4 Ânion superóxido

A produção de ânion superóxido foi estimada pelo ensaio de redução do tetrazolium nitroblue (NBT). Macrófagos (0,45 mL) em suspensão em PBS foram incubados por 1 h a 37°C na presença de 0,03 ml de acetato de forbol miristil (PMA, concentração final de 5 μ M) e NBT a 0,1%. A reação foi suspensa pela adição de 0,5 ml de ácido acético. A mistura foi então centrifugada por 30 s a 2500 g. A redução do NBT resultou na formação do formazan azul, que foi detectado espectrofotometricamente (560 nm). Os resultados foram expressos em absorbância.mg⁻¹ proteína (MADHAVI, 1994).

3.9.12.5 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) foi mensurado como nitrito (NO₂⁻). Macrófagos (2x10⁵ em um volume final de 0,2 mL) foram incubados por 24 h na presença de LPS (10 μ g.mL⁻¹ concentração final). A concentração de nitrito foi mensurada pela reação de Griess. Volumes iguais de sobrenadante do cultivo celular e o reagente de Griess foram incubados por 10 min à temperatura ambiente e absorbância foi mensurada a 550 nm. A concentração de NO₂⁻ foi determinada de uma curva-padrão feita com NaNO₂ (STUEHR e MALETTA, 1985). A produção de nitrito foi expressa por μ mol.L⁻¹.

3.9.12.6 Determinação de proteína

A concentração de proteína nos preparados dos macrófagos foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), com uso da albumina sérica bovina como padrão.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão médio (EPM) dos grupos experimentais. As diferenças estatísticas, com nível de significância mínimo para $P < 0,05$, foram determinadas por:

- “one way” e ANOVA (Análise de Variância), seguido de pós-teste de Tukey para os seguintes casos:
 - variação de peso corpóreo dos grupos: A100, A50 e C (Fig. 22); A100-S, A50-S e C-S (Fig. 23); A10Lip, CLip e C (Fig. 25).
 - peso corpóreo do tumor e da carcaça para todos os grupos com S-180 (Tabelas 12 e 13);
 - do volume de água ingerido e de urina excretada (Fig. 27),
 - concentrações plasmáticas de proteína total, albumina e globulina; metabolismo protéico (Fig. 28);
 - concentrações plasmáticas de creatinina, uréia, ácido úrico, TGO e TGP (Fig. 29);
 - concentrações plasmáticas de glicose dos grupos A10Lip, CLip e C (Fig. 32);
 - concentrações plasmáticas de lipídeos totais, triacilgliceróis, colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, relação HDL:colesterol, razão triacilgliceróis:HDL e índice aterogênico dos grupos A10Lip, CLip e C (Fig.36);
- por “one way” e ANOVA, seguintes seguido de T teste para os seguintes casos:
 - variação de peso corpóreo para os grupos: A10 e C (Fig. 24); e A10-S e C-S (Fig. 26);
 - peso do baço (Fig. 39);
 - concentrações plasmáticas de glicose dos grupos A10 e C (Fig. 31);
 - concentrações plasmáticas de lipídeos totais, triacilgliceróis, colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, relação HDL:colesterol, razão triacilgliceróis:HDL e índice aterogênico dos grupos A10 e C (Fig.35);
 - células esplênicas dos grupos A10 e C (Fig. 42);
 - células esplênicas dos grupos A10-S e C-S (Fig. 43);
 - células de linfonodos dos grupos A10-S e C-S (Fig. 44);
 - concentração de citocinas plasmáticas dos grupos A10 e C (Tabela 17);

- concentração de citocinas no sobrenadante de macrófagos dos grupos A10 e C (Tabela 18);
- concentração de parâmetros oxidativos de macrófagos dos grupos A10 e C (Fig. 46);
 - por “two way” com pós-teste de Bonferroni para os seguintes casos:
- concentrações plasmáticas de glicose dos grupos A100, A50, C, A100-S, A50-s e C-S (Fig. 30);
- concentrações plasmáticas de lipídeos totais, triacilgliceróis, colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol dos grupos A100, A50 e C, sem e com S-180 (Fig.33);
- relação HDL:colesterol, razão triacilgliceróis:HDL e índice aterogênico dos grupos A100, A50 e C, sem e com S-180 (Fig. 34);
- células esplênicas dos grupos A100, A50 e C (Fig. 40);
- células de linfóndos dos grupos A100, A50 e C (fig. 41);
- concentração de citocinas dos grupos A100, A50 e C, sem e com S-180 (Tabela 16);
- concentração de citocina de TNF- α dos grupos A100, A50 e C, sem e com S-180 (Figura 45);
- concentração de parâmetros oxidativos de macrófagos dos grupos A10Lip, CLip e C (Fig. 47).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA POR DOSAGEM DE ERGOSTEROL

A partir da área dos picos resultante da análise cromatográfica do padrão de ergosterol, e respectivas diluições, obteve-se por regressão linear a expressão: " $y = 56051A + 4E+06$ ", onde A= área do pico, com $R^2 = 0,998$. A recuperação do processo de extração do ergosterol foi estimada em 49,3%, segundo CARVALHO *et al.*, (2005). Os dados obtidos de concentração de ergosterol na biomassa, na forma de inóculo, possibilitaram obter os resultados onde um g de biomassa produzida por cultivo submerso (base seca) continha 6,936 mg de ergosterol.

4.2 CULTIVO EM MEIO LIQUÍDO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *A. BRASILIENSIS*

A biomassa produzida por cultura submersa foi calculada em função da área obtida nos cromatogramas, que serviram para o cálculo da concentração de ergosterol das amostras obtidas ao longo do tempo (Tabela 8). Os valores mensurados do pH final também estão expressos na Tabela 8.

TABELA 8 - Área dos cromatogramas, concentração de ergosterol, biomassa produzida e pH final em cultura líquida em função do tempo.

Dias de cultura	Área do cromatograma	Ergosterol (mg.g ⁻¹ Base Seca)	Biomassa (g)	pH (final)
5	119039408	11,897	1,774	4,63
7	113934648	7,166	1,069	4,80
10	99208456	10,605	1,581	5,23
14	131525328	10,891	1,624	5,85

A concentração de biomassa apresentou um decréscimo no sétimo dia de cultivo, e foi observado igualmente um aumento nos valores do pH no transcorrer do tempo.

Na Figura 16 podem ser visualizadas as hifas do micélio de *A. brasiliensis* produzido em cultivo submerso.

FIGURA 16 - Microfotografia de micélio de *A. brasiliensis* LPB-03 (aumento de 400 vezes).



4.3 CULTIVO DE *A. BRASILIENSIS* EM SUBSTRATO SÓLIDO A BASE DE TRIGO INTEGRAL

4.3.1 Análises do substrato e material cultivado

O trigo em grãos utilizado no cultivo de *A. brasiliensis* estava isento de micotoxinas (Anexo II) e os resultados das análises da composição centesimal, tanto do substrato como do material cultivado, expressos na Tabela 9, foram utilizados para os cálculos de formulação da ração.

TABELA 9 - Composição centesimal de trigo e trigo cultivado utilizado como base para formulação da ração para alimentação de camundongos nos Experimentos I e II.

Análise	Trigo em grãos(%)	Trigo cultivado (%)
Umidade	5,96	6,71
Proteínas	14,46	21,09
Lipídeos	2,02	2,58
Fibras	2,71	3,80
Cinzas	1,75	2,58
Carboidratos*	73,09	63,24

* calculado por diferença dos constituintes principais.

4.3.2 Determinação da biomassa em trigo cultivado por *A. brasiliensis*

Com o resultado obtido dos cálculos de concentração de ergosterol para determinação da produção de biomassa por cultivo submerso foi possível estimar a quantidade de biomassa micelial presente no trigo cultivado: 0,291 g de biomassa fúngica por grama de material cultivado, em base seca, o que corresponde a 29% de biomassa fúngica (Tabela 10).

TABELA 10 - Área do cromatograma, concentração de ergosterol e biomassa produzida em cultivo sólido (trigo integral) por *A. brasiliensis* em colunas com aeração forçada em função do tempo.

Tempo de cultivo (dias)	Área do cromatograma	Ergosterol (mg.g ⁻¹ BS*)	Biomassa (g.g de cultivado ⁻¹ BS*)
14	96435448	1,9514	0,2907

*BS = Base Seca

4.3.3 Cultivo no Estado Sólido em colunas

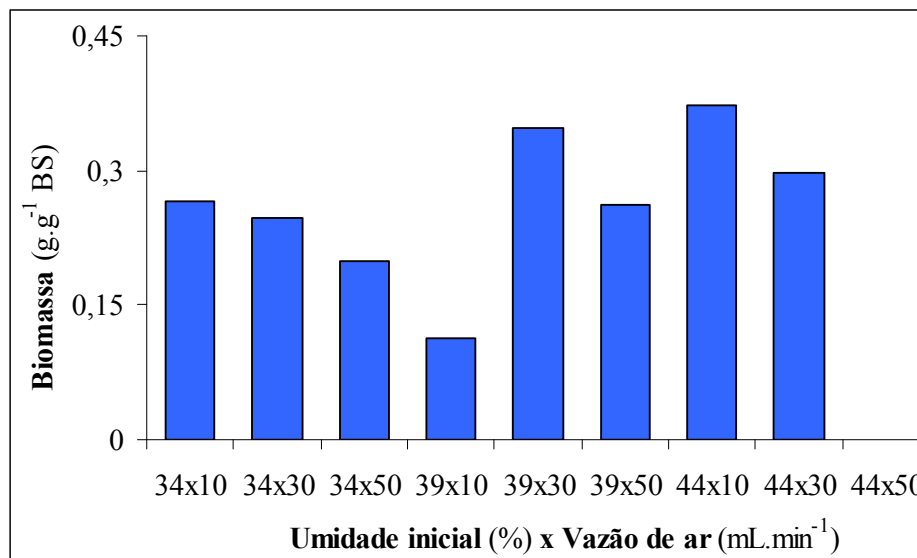
4.3.3.1 Determinação da umidade inicial e aeração

Os resultados obtidos para determinação da umidade ideal inicial do substrato e aeração para o cultivo de *A. brasiliensis* em colunas com aeração forçada estão expressos na Figura 17.

As colunas n^{os} um a três apresentaram um desenvolvimento de micélio lento (Foto 1 da Figura 18), cujas condições de cultivo foram 35% de umidade inicial do substrato com respectiva vazão de ar de 10, de 30 e 50 mL.min⁻¹ para as colunas 1, 2 e 3. Nestas três colunas ao final do período de cultivo o interior do substrato encontrava-se parcialmente sem a presença visual do micélio. Observou-se que inicialmente ocorreu um desenvolvimento aparentemente melhor nas colunas n^{os} oito e nove, com maior porcentagem de umidade e de aeração; porém, a partir do décimo dia de cultivo o substrato começou a ficar com coloração escura (Foto 5 da Figura 18), e ao final de 14 dias encontrava-se parcialmente desintegrado, esfarelado, e extremamente úmido (Foto 6 da Figura 18), especialmente a coluna n^o nove, com 44% de umidade. O resultado da análise de ergosterol confirmou o que se apresentava visualmente, a

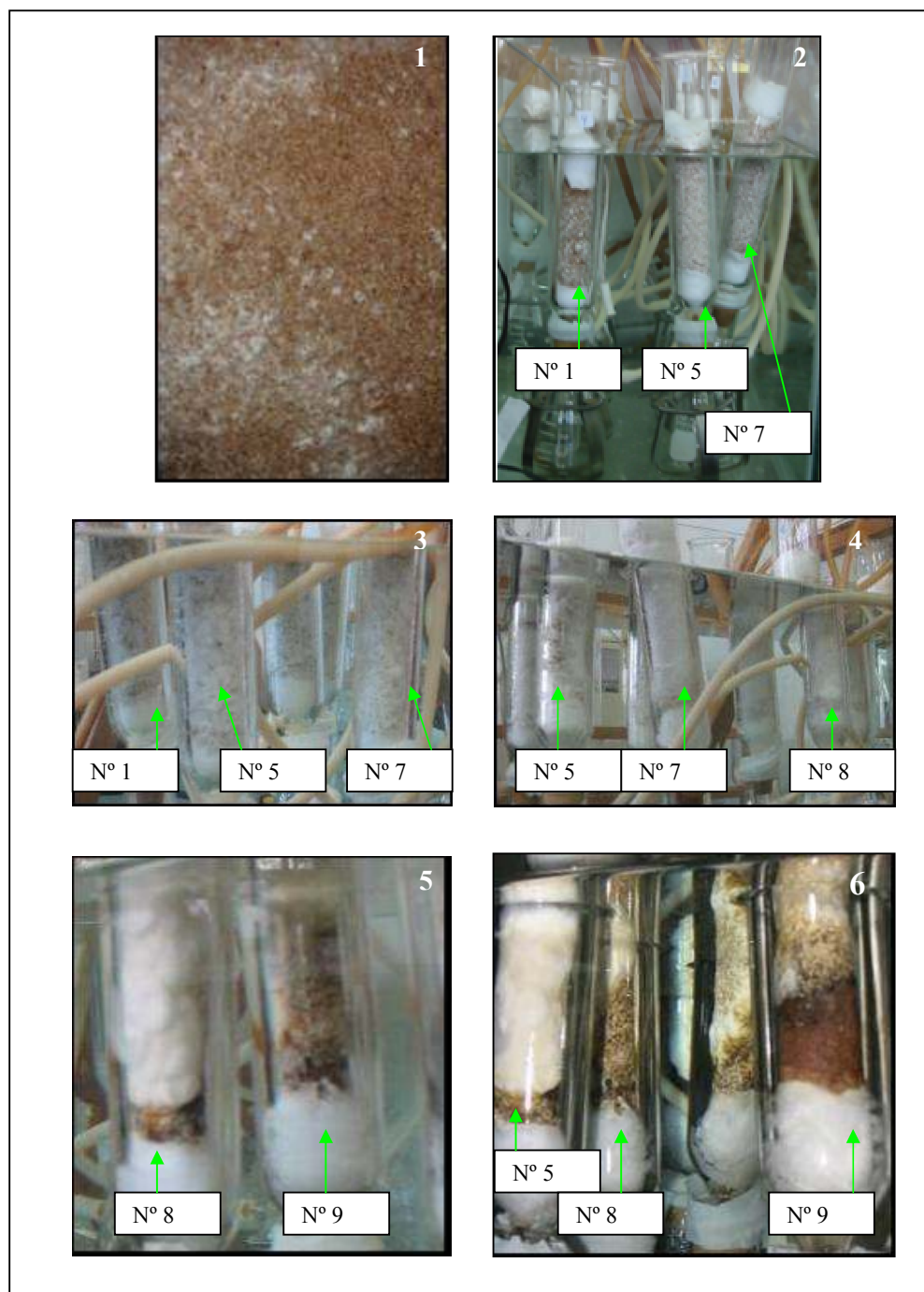
melhor condição de desenvolvimento de *A. brasiliensis* em colunas ocorreu na coluna nº sete, com 44% de umidade inicial do substrato e vazão de ar de 10 (mL.min⁻¹), condição mais próxima àquela utilizada para produção da ração dos animais; este resultado pode ser observado na Figura 17.

FIGURA 17 - Crescimento e biomassa produzida por *A. brasiliensis* em trigo com aeração forçada



Durante o cultivo observou-se diferenças importantes na produção de micélio entre as colunas, conforme pode ser verificado na Figura. 18.

FIGURA 18 - Efeito de umidade inicial e vazão de ar no cultivo de *A. brasiliensis* em trigo:em colunas.

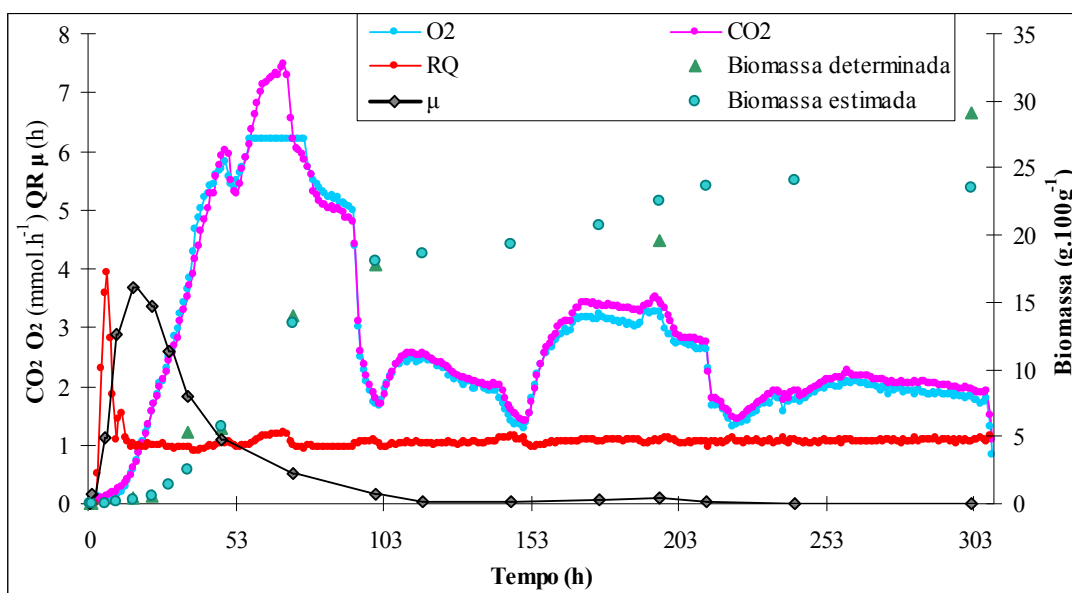


NOTA: 1) Início do desenvolvimento no primeiro dia da coluna nº um; 2) no segundo dia; 3) quinto dia; 4) oitavo dia; 5) 12º dia e 6) no 14º dia de cultivo. As colunas estão identificadas com os números que correlacionam as condições de cultivo de umidade inicial do substrato x vazão de ar (mL.min⁻¹): nº 1- 34x10; nº 5- 30x30; nº 7- 44x10; nº 8- 44x30 e nº 9- 44x50.

4.3.3.2 Análise respirométrica

Os resultados da análise respirométrica realizada durante o desenvolvimento de micélio de *A. brasiliensis* em colunas com aeração forçada, com trigo integral como substrato e suporte estão expressos na Figura 19. O pico de produção de CO_2 foi de $7,48 \mu\text{mol.h}^{-1}$ e ocorreu após 69 horas de cultivo. O valor mediano do coeficiente de respiração (QR) obtido neste cultivo foi de 1,07, conforme pode ser visualizado na Figura 19.

FIGURA 19 - Estimativa da Taxa de Consumo de Oxigênio, produção de gás carbônico, coeficiente de respiração QR, biomassa determinada, biomassa estimada e velocidade específica de crescimento μ ($\times 100$) durante desenvolvimento de *A. brasiliensis* cultivado em meio sólido a base de trigo, em colunas com aeração forçada, com umidade inicial do substrato de 39% e vazão de ar de 10 mL.min^{-1} .



A taxa de consumo de O_2 e produção de CO_2 é o resultado do metabolismo energético do microrganismo, propiciando energia para o seu crescimento e manutenção. O processo de cultivo em meio sólido a base de trigo por *A. brasiliensis* demonstrou ser um sistema aeróbico em quase todo o período do cultivo. Os primeiros pontos do coeficiente de respiração resultaram em um QR elevado, fase onde o microrganismo encontrava-se em adaptação ao substrato, com intensa atividade metabólica e início do desenvolvimento do micélio, conforme pode ser visto na Figura

19. A partir de dez horas de cultivo, valores de QR próximos a um logo se instauraram e assim se mantiveram até 302 horas de cultivo.

4.3.3.3 Determinação de parâmetros de bioprocessos

Os dados apresentados na Tabela 11 foram utilizados no programa Fersol e representam o balanço de uma coluna de cultivo.

Determinados parâmetros foram estimados a partir dos resultados de taxa de consumo de O_2 e de produção de CO_2 . A estimativa da biomassa em determinado tempo (X_n) consistiu em assumir valores para seu rendimento baseado no consumo de ($Y_{X/O}$) e no coeficiente de manutenção da biomassa (m_x). O software permitiu a determinação do coeficiente da equação por aproximação sucessiva.

A partir dos valores da taxa de consumo do O_2 e da produção de CO_2 , obtidos experimentalmente, o programa determinou o rendimento da biomassa ($Y_{X/O}$) de 1,949g de biomassa por g de O_2 consumido e um coeficiente de manutenção de biomassa (m_x) de 0,0027 g de O_2 consumido por g de biomassa produzida por h.

TABELA 11 - Valores do tempo, da biomassa determinada, do CO_2 produzido e da taxa de consumo de O_2 de *A. brasiliensis* cultivado em meio sólido a base de trigo, em colunas com aeração forçada, com umidade inicial do substrato de 39% e vazão de ar de 10 mL.min⁻¹, usados para cálculos da biomassa estimada e outros parâmetros cinéticos através do programa Fersol.

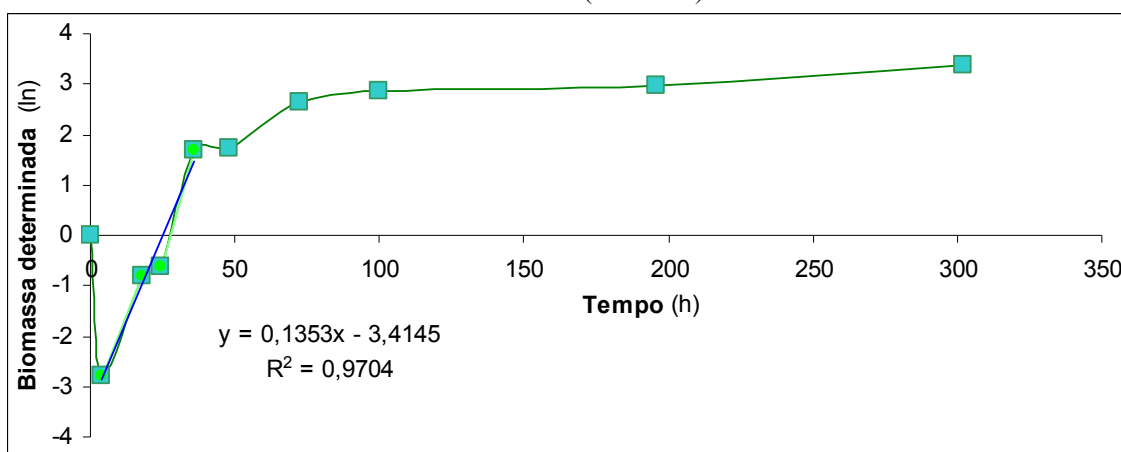
Tempo de cultivo (h)	Biomassa determinada (g.100g ⁻¹)	CO_2 produzido (μmol.h ⁻¹)	Taxa de consumo de O_2 (μmol.h ⁻¹)	Biomassa estimada (g.100g ⁻¹)
4	0,062	0,000	-0,057	0,062
18	0,439	0,597	0,588	0,232
24	0,532	1,555	1,581	0,625
36	5,368	3,510	3,662	2,454
48	5,661	5,922	5,691	5,713
72	14,034	6,214	6,217	13,46
100	17,826	1,781	1,708	18,05
196	19,526	3,441	3,273	22,545
302	29,073	1,938	1,814	23,566

O pico de biomassa estimada ocorreu às 242 horas de cultura com X de 24,08 g.100g⁻¹ e com velocidade específica de crescimento (μ) de 0,087 h⁻¹. Na 18ª h de cultura o $\mu_{\text{máx}}$ alcançou o valor de 0,1617 h⁻¹. O coeficiente de correlação (R^2) da equação para a estimativa de biomassa foi de 0,955, o que indica uma boa correlação entre os dados experimentais e o modelo utilizado.

4.3.3.4 Cinética da produção de biomassa

A cinética da produção de biomassa determinada experimentalmente, via dosagem do ergosterol encontra-se expresso na Figura 20. Os dados, apresentados na forma logarítmica, permitem visualizar a fase exponencial de crescimento do cogumelo *A. brasiliensis* em trigo, em colunas com aeração forçada, que ocorreu a partir das quatro até 36 horas de cultivo. A partir da regressão linear obteve-se a expressão “ $y = 0,1353x - 3,4145$ ”, com $R^2 = 0,9704$, o que indica uma boa correlação entre os dados experimentais e o modelo. Após 36 h de cultivo observou-se a fase de crescimento.

FIGURA 20 - Biomassa (ln) produzida por *A. brasiliensis* por cultivo em trigo em colunas, com 39% de umidade inicial do substrato e 10 (mL.min⁻¹) de vazão de ar.



A fase de adaptação ao substrato, ou fase “Lag” teve duração de 4 horas, e nesta etapa o microrganismo estava iniciando seu desenvolvimento micelial sobre as partículas de trigo. O coeficiente respiratório QR apresentou valores muito baixos

somente até a 6ª h de cultivo, quando se iniciou a produção de CO₂ (Figura 19). Esta fase adaptativa, de curta duração, tem grande importância, pois possibilita uma efetiva redução nos níveis de contaminação. A contaminação é uma dos principais problemas que ocorre, tanto em institutos especializados como entre produtores de cogumelos, na produção de “spawn” ou “sementes de cogumelos”, como são denominados popularmente os grãos recobertos por micélio e usados para semeadura no solo.

A fase de pré-inóculo, a etapa de filtração da biomassa seguida do desenvolvimento do inóculo com agitação para desenvolvimento de “pellets” de segunda geração, propicia a obtenção de uma suspensão de micélio fragmentado. Esta suspensão resulta no rápido desenvolvimento do cogumelo sobre o substrato sólido (trigo), usualmente entre 14 a 18 dias. Em uma produção normal de “spawn”, pedaços de meio sólido cobertos com micélio desenvolvido são inoculados em grãos, neste processo o tempo de incubação é de 30 dias. Esta técnica de produção de inóculo em cultura líquida, permite uma redução de 50% no tempo de cultivo de *A. brasiliensis* sobre o grão de trigo, fator de fundamental importância no caso de escalonamento deste bioprocessos.

Após a quarta hora de cultivo o micélio passou a se desenvolver rapidamente, apresentando então a fase exponencial, conforme demonstrado na Figura 20.

Entre a 6ª e 12ª h, o valor do QR aumentou e alcançou seu valor máximo, de 3.94 na 11ª h de cultivo. Este dado revelou uma atividade respiratória muito intensa, resultante de uma maior produção de CO₂ e menor consumo de O₂ no sistema. Nesta fase a velocidade específica de crescimento μ foi de 0,049 h⁻¹ e a biomassa foi estimada em 0,065 g.100g⁻¹.

Os valores do RQ decresceram a próximo do valor de um após 12 h; e se mantiveram com uma média de 1,07 até o final do experimento, que é característico de uma atividade metabólica aeróbica. Os valores de μ foram estimados em 0,126 h⁻¹ na 15ª h (Fig. 19). A produção de CO₂ esteve associada ao consumo de O₂ nesta fase. O desenvolvimento do micélio foi intenso, pois a velocidade específica de crescimento μ alcançou seu valor máximo na 21ª h, com $\mu = 0.161$ h⁻¹, e com biomassa determinada de 0.439 g.100g⁻¹. A biomassa foi estimada pelo programa Fersol como sendo de

0,625 g.100g⁻¹ na 24^a h de cultivo. O cogumelo apresentou um decréscimo na velocidade específica até a 116^a h de cultivo. Durante estas fases, foi possível observar visualmente a propagação das hifas do micélio recobrando todo o substrato até envolver todas as partículas de trigo, que se tornou esbranquiçado e com aspecto algodinoso.

Os valores encontrados para a biomassa determinada experimentalmente, via ergosterol, e para a biomassa estimada pelo programa Fersol revelaram grande similaridade até 75 h de cultivo, conforme pode ser observado na Tabela 11. Os valores de μ decresceram a 0,047 h⁻¹ na 48^a h e permaneceram próximos a 0,002.h⁻¹, com incremento da espessura do micélio sobre o trigo, e inclusive com desenvolvimento deste sobre o algodão presente no início e final das colunas de Raimbault.

A fase de crescimento micelial, observada na Figura 20, coincidiu com a fase de máxima atividade respiratória. A taxa de consumo de O₂ a produção de CO₂ foi extremamente elevada entre 57 e 76 horas, indicando um intenso metabolismo do fungo. A produção máxima de CO₂ ocorreu na 69^a h de cultivo. Nesta fase foi possível observar visualmente o desenvolvimento de *A. brasiliensis*, que cobriu rapidamente as partículas de trigo (Foto 2 da Figura 18).

A produção de CO₂ decresceu após 78 h, e depois deste período, foi possível observar aumento na produção de CO₂ e no consumo de O₂ em duas fases; a primeira ocorreu entre 105 a 126 horas, com uma média de 2,4 μ mol de CO₂ produzido e de O₂ consumido. A segunda fase de incremento na atividade respiratória ocorreu entre 156 a 213 h, com valores médios de 3,0 μ mol na produção de CO₂ e consumo de O₂. É possível que o cogumelo tenha produzido enzimas para degradação de outros compostos do substrato durante estas fases.

A biomassa determinada foi de 19,526 g.100g⁻¹ na 196^a h, enquanto a biomassa estimada apresentou valores de 22,545 g.100g⁻¹. Os dados apresentados da biomassa determinada e estimada até este ponto ($t=196$) demonstraram boa correlação entre a dosagem de ergosterol e produção de CO₂, respectivamente, para análise de biomassa. O software calculou o valor máximo de produção de biomassa estimada como sendo

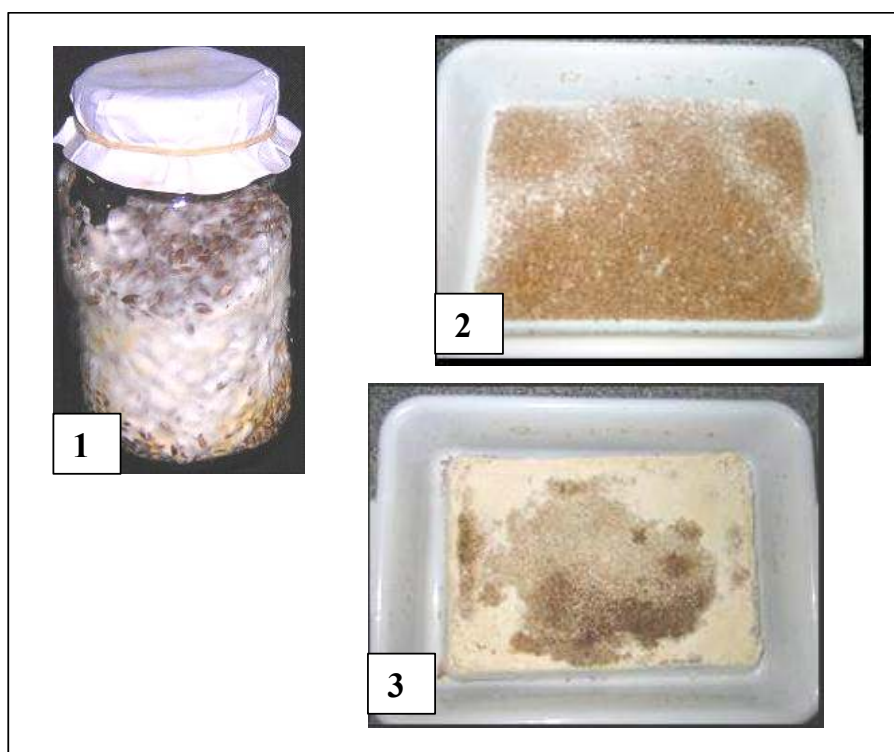
de 24,081 g.100g⁻¹ na 242^a h. O programa estimou um decréscimo na produção de biomassa após este ponto, resultando em uma aparente fase estacionária após 242 h de cultivo. Entretanto, observando os valores de biomassa estimada e determinada na 302^a h, verifica-se uma diferença entre estes valores. A biomassa determinada apresentou seu valor máximo de 29,073 g.100g⁻¹, contra 23,566 g.100g⁻¹ da biomassa estimada para o mesmo ponto. Desta forma, observando-se a curva de crescimento da biomassa determinada (Figura 19), é possível observar que pode haver uma continuidade na fase de desenvolvimento do micélio, além dos 14 dias de cultivo analisados neste experimento. A interrupção do cultivo foi feita em função da inviabilidade de uso de mais colunas no sistema de cultivo. Outras pesquisas dão suporte a esta evidência, a fermentação no estado sólido do cogumelo *Cordyceps sinensis* demonstrou que o pico de produção de H1A, que é um derivado do ergosterol, foi obtido no 38º dia, e decresceu após longos períodos de fermentação. Neste trabalho, os autores também verificaram aumento no peso seco do micélio (g) durante os primeiros 34 dias de incubação, e permaneceu constante no período entre 34 e 50 dias (LI *et al.*, 2003). Pesquisas futuras são necessárias para determinar a duração das fases exponencial, estacionária e de declínio do cogumelo *A. brasiliensis*, produzido em trigo como substrato, em biorreatores de colunas com aeração forçada.

4.3.4 Cultura no estado sólido em frascos e bandejas de *A. brasiliensis* em substrato a base de trigo

Para execução dos experimentos de alimentação dos camundongos durante semanas, foi necessária uma produção de grande quantidade de trigo cultivado. Inicialmente o cultivo foi realizado dentro de frascos de vidro e, em uma segunda etapa, dentro de bandejas. Os cálculos foram baseados nos dados de que um camundongo precisa de 5 g de alimento ao dia, lembrando que parte do alimento é desperdiçada pelo animal, especialmente se este é oferecido em bandejas, e não na forma de “pellets” de ração, como ocorre na alimentação normal de camundongos no Biotério.

O cultivo no estado sólido em frascos e em bandejas possibilitou a obtenção da quantidade de material cultivado necessário para os Experimentos I, II e III. Na Figura 21 pode ser visualizado o aspecto do trigo após 18 dias de cultivo por *A. brasiliensis*. Observou-se compactação do material cultivado em bloco, tanto no frasco como na bandeja, ocasionado pelo desenvolvimento do micélio em todo o substrato, exceto na parte superior. Nas regiões próximas ao vidro e na parte inferior do material cultivado na bandeja observou-se a presença de algumas áreas com coloração amarelada ou mais escura, que pode ter sido ocasionada pela produção de algum metabólito ou pela condensação d'água em alguns pontos da bandeja (Figura 21).

FIGURA 21 - Produção em frasco (1) e bandeja (2 e 3), de *A. brasiliensis* em trigo, após 18-20 dias de incubação.



NOTA: Foto 2 material cultivado formando bloco compacto na bandeja, Foto 3 mesmo material invertido para visualização de sua parte inferior.

A obtenção dos dados da respirometria e da dosagem de ergosterol foi importante para estimar a quantidade de biomassa cultivada em trigo, em condições semelhantes àsquelas utilizadas para produção da ração feita em frascos e bandejas.

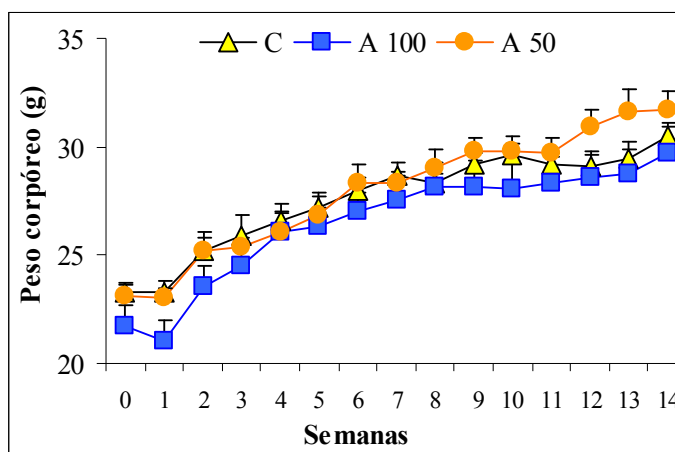
Desta forma foi possível correlacionar a quantidade de biomassa produzida no sistema de colunas com o de bandejas, possibilitando assim uma estimativa de biomassa presente na ração.

4.4 EFEITOS METABÓLICOS DA RAÇÃO PRODUZIDA POR TRIGO CULTIVADO COM *A. BRASILIENSIS* EM CAMUNDONGOS

4.4.1 Evolução da massa corpórea

Os dados de ganho de peso corporal, em g, durante as 14 semanas de alimentação, dos grupos A100, A50 e C, sem e com S-180 estão apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente. As análises estatísticas resultaram em ausência de diferença estatística ao nível de $P > 0,05$, entre os tratamentos dos grupos inoculados com S-180 como para os grupos sem S-180.

FIGURA 22 - Variação de peso corpóreo, em g, de camundongos normais alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.

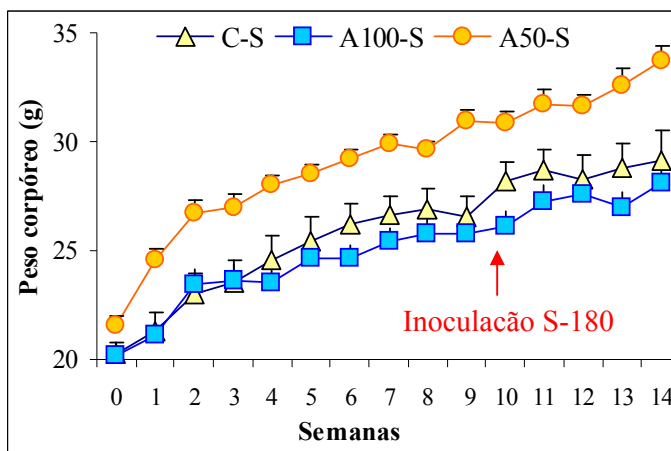


NOTA: Os dados representam a média \pm EPM de 10 animais por grupo.

Os animais do grupo A50 apresentaram um aumento de peso superior nas últimas três semanas de alimentação, se comparado com os outros grupos; e o ganho de peso foi de 15% quando comparado com o grupo C. Este dado, apesar de não apresentar diferença estatística, indica uma tendência de ganho de peso, que pode ser resultante do bom aproveitamento dos nutrientes da dieta, na dosagem de A50. O

ganho menor de peso do grupo A100, comparado ao grupo A50, pode ser explicado pela possível presença de algum fator que possa ter influenciado a absorção dos nutrientes. Pesquisadores das Faculdades Evangélica em Curitiba, PR, observaram que a ingestão *in natura* deste cogumelo propiciou baixa eficiência na conversão alimentar em animais, semelhante ao que ocorre com cenouras, por ex., onde a ingestão *in natura* também propicia menor conversão alimentar do que quando cozidas (WRONISKI, 2004).

FIGURA 23 - Variação de peso corpóreo, em g, de camundongos inoculados na décima semana com S-180 e alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A100-S e A50-S - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C-S - ração sem adição de cogumelo.

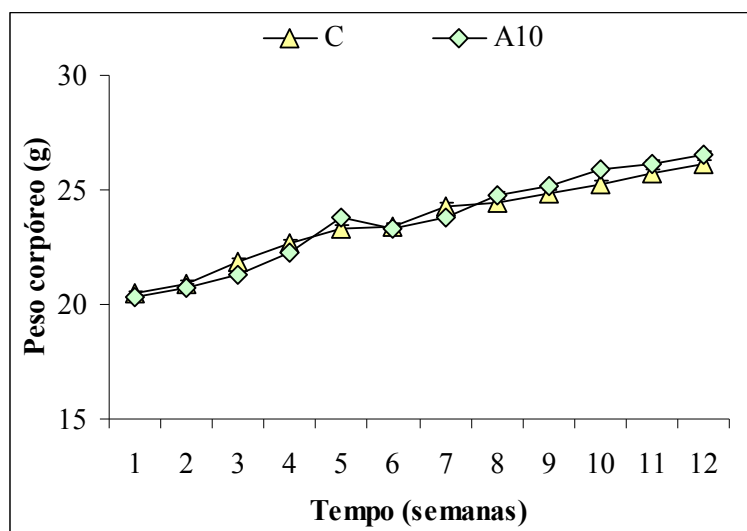


NOTA: Os dados representam a média \pm EPM de 10 animais por grupo.

Observando-se os resultados da Figura 23, verifica-se que os animais dos grupos C-S e A100-S apresentaram uma estabilização ou pequeno ganho de peso após a inoculação das células tumorais. O grupo A50-S apresentou um contínuo ganho de peso, superior ao dos outros grupos, antes e após a inoculação do tumor. O ganho de peso dos animais após o implante do S-180 não apresentou diferença estatística entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Os dados de ganho de peso corporal, em g, durante as 12 semanas de alimentação, dos grupos C e A10 estão apresentados na Figura 24. Os animais dos dois grupos ganharam peso ao longo do tempo de modo semelhante, sem diferenças estatísticas entre os grupos ($P > 0,05$).

FIGURA 24 - Variação de peso corpóreo, em g, de camundongos normais alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A10- ração com 2,9% de micélio, C - ração sem adição de cogumelo.

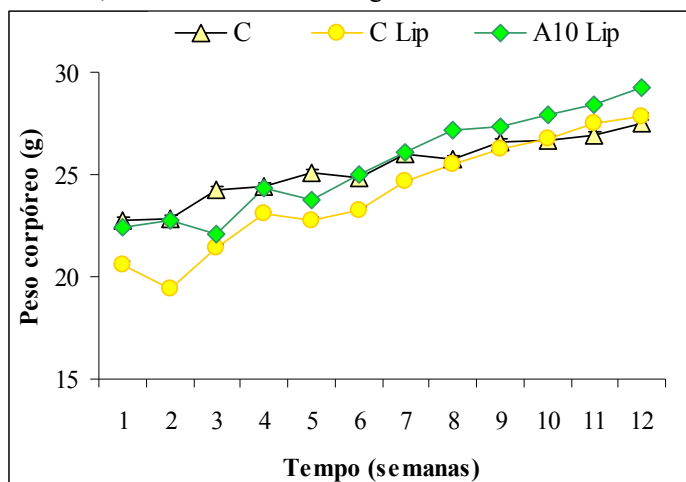


NOTA: Os dados representam a média \pm EPM de 7 animais por grupo.

O micélio assim como o corpo de frutificação do cogumelo *A. brasiliensis* possui importante valor nutricional, pois é rico em proteínas, fibras, carboidratos e possui baixas concentrações de lipídeos (MIZUNO, 1995; HUANG *et al.*, 1999; SHIBATA; DEMIATE, 2003). A ingestão de *A. brasiliensis* no grupo A10 (Fig. 24) não causou aumentos ou perdas no ganho de peso, o que demonstra que a concentração de 2,9% de micélio ingerida pelos animais foi segura e não ocasionou efeitos colaterais indesejáveis aparentes.

Os dados de ganho de peso corporal, em g, durante as 12 semanas de alimentação, dos grupos C; CLip e A10Lip, estão apresentados na Figura 25. A presença de lipídeos ocasionou maior ganho de peso nos grupos CLip, de 35% e no grupo A10Lip de 30%, se comparado ao ganho de peso do grupo C, com 21% de aumento de peso. As análises estatísticas, realizadas com os dados de peso semanais não apresentaram diferenças ao longo do tempo ($P > 0,05$), entretanto é possível verificar que os grupos com 5% de gordura saturada apresentaram maior ganho de peso, o que era esperado. A ingestão de ração suplementada com *A. brasiliensis* a 2,9% e gordura saturada a 5% pelo grupo A10Lip resultou em menor ganho de peso do que na ausência do cogumelo (CLip).

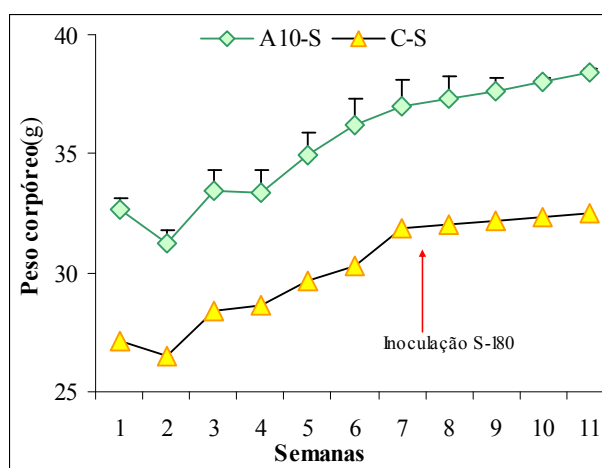
FIGURA 25 - Variação de peso corpóreo, em g, de camundongos normais alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo C - ração sem adição de cogumelo; CLip - ração com adição de 5% de gordura saturada; A10Lip - ração com 2,9% de micélio e 5% de gordura saturada.



NOTA: Os dados representam a média \pm EPM de 6 animais para o grupo C; e de 7 para os grupos CLip e A10Lip.

Os dados de ganho de peso corporal, em g, durante as 11 semanas de alimentação, dos grupos A10-S e C-S estão apresentados na Figura 26. O aumento de peso dos dois grupos foi de 18% e 20%, aproximadamente, para os grupos A10-S e C-S, com ausência de diferença estatística ao nível de $P > 0,05$.

FIGURA 26 - Variação de peso corpóreo, em g, de camundongos inoculados na sétima semana com S-180 e alimentados durante 11 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A10-S - ração com 2,9% de micélio, C-S - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Os dados representam a média e EPM de 9 animais por grupo.

4.4.2 Peso corpóreo e de tumor

Os dados referentes ao peso corpóreo e de tumor dos animais portadores de S-180 (grupos A100-S, A50-S e C-S) com e sem suplementação com o cogumelo *A. brasiliensis* estão apresentados na Tabela 12. O peso dos animais no dia da inoculação do tumor e no ao final de 30 dias não apresentou diferenças estatísticas ($P > 0,05$), porém observou-se ganho de peso de 5,44% e de 9,72% para os grupos A100-S e A50-S, respectivamente, enquanto no grupo C-S o ganho de peso corpóreo foi de 2,02%. A subtração do peso do tumor do peso final resultou no peso da carcaça. Os dados de variação de peso corpóreo do grupo C-S indicam que o S-180 não ocasionou caquexia aparente.

TABELA 12 - Peso corpóreo, do tumor e da carcaça dos animais portadores de Sarcoma 180, no período de 30 dias, dos grupos: C-S ração sem adição de cogumelo, A100-S e A50-S - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente.

	Grupos de camundongos portadores do Sarcoma 180		
	C-S	A100-S	A50-S
Peso corpóreo (g) antes da inoculação do tumor	29,98 ± 0,61	25,97 ± 1,16	30,99 ± 0,69
Peso corpóreo (g) no 30º dia de inoculação do tumor	31,46 ± 0,60	28,03 ± 1,27	34,39 ± 1,08
Peso do tumor(g)	0,87 ± 0,12	0,72 ± 0,34	0,38 ± 0,15
Peso da carcaça (g)	30,59 ± 0,71	27,31 ± 1,03	34,01 ± 0,98
Variação de peso corpóreo (g)	0,61 ± 0,26	1,34 ± 0,25	3,02 ± 0,57
Variação de peso corpóreo (%)	2,02 ± 0,83	5,44 ± 1,10	9,72 ± 1,85

NOTA: Dados representam média ± EPM, de n=4.

Os dados referentes ao peso corpóreo e de tumor dos animais portadores de S-180 (A10-S e C-S) com e sem suplementação com o cogumelo *A. brasiliensis* estão apresentados na Tabela 13. O peso dos animais no dia da inoculação do tumor e no ao final de 30 dias não apresentou diferenças estatísticas ($P > 0,05$), para os dois grupos o ganho de peso foi de aproximadamente 1%. A subtração do peso do tumor do peso final resultou no peso da carcaça.

TABELA 13 - Peso corpóreo, do tumor e da carcaça dos animais portadores de Sarcoma 180, no período de 30 dias, dos grupos: C-S ração sem adição de cogumelo, A10-S - ração com adição de 2,9%.

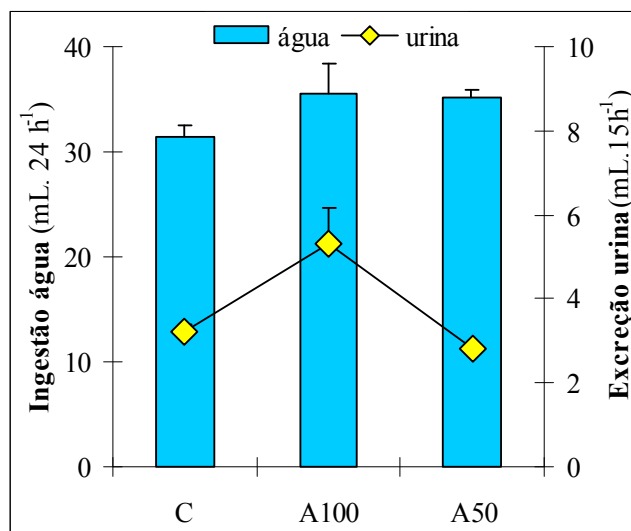
	Grupos de camundongos portadores do Sarcoma 180	
	C-S	A10-S
Peso corpóreo (g) antes da inoculação do tumor	32,01 ± 0,98	37,30 ± 0,48***
Peso corpóreo (g) no 21º dia de inoculação do tumor	32,54 ± 1,19	38,40 ± 1,29**
Peso do tumor(g)	0,95 ± 0,21	0,67 ± 0,20
Peso da carcaça (g)	31,59 ± 1,03	37,74 ± 1,19**
Variação de peso corpóreo (g)	-0,42 ± 0,24	0,44 ± 0,12***
Variação de peso corpóreo (%)	-1,32 ± 1,10	1,17 ± 0,98***

NOTA: Dados representam média ± EPM, de n=9. ** $P < 0.01$ vs. C; *** $P < 0.001$ vs. C.

4.4.3 Ingestão de água e excreção de urina

Na Figura 27 estão representados graficamente os resultados da ingestão de água dos grupos A100 e A50 durante um período de cinco semanas.

FIGURA 27 - Volume de água ingerido, durante a quarta e nona semana, e de urina excretada, em intervalos de 15 h, de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: . Os dados representam a média ±EPM de 20 animais por grupo.

Apesar de um pequeno aumento na quantidade de água ingerida pelos animais dos grupos A100 e A50, com valores de 35,55 mL.24h⁻¹ e de 35,18 mL.24h⁻¹,

respectivamente, comparada a $31,35 \text{ mL.24h}^{-1}$ para o grupo controle (C), estatisticamente não houve diferenças entre os três grupos ($P > 0,05$). A diurese entre os grupos apresentou diferenças quanto ao volume, para os grupos A100 e A50, com valores de $5,3 \text{ mL.24h}^{-1}$ e de $2,8 \text{ mL.24h}^{-1}$, respectivamente, comparada ao $3,2 \text{ mL.24h}^{-1}$ para o grupo controle (C), porém, sem diferença estatística, em função da grande variância apresentada entre as tomadas de amostras.

A diurese normal pode sofrer alterações por influência do volume corporal, consumo de líquidos, sudoração e temperatura ambiente. O aumento da diurese, denominada de poliúria, tem como principais causas grande ingestão de líquidos, insuficiência renal crônica e diabetes (MUSSO *et al.*, 2004).

A concentração e diluição da urina são essenciais para a manutenção do balanço hidroeletrolítico em mamíferos (MASILAMA *et al.*, 2000). Este mecanismo está relacionado com a concentração de sais no plasma. Baixas concentrações de sódio no plasma estimulam as células renais a produzirem renina, que por sua vez converte o angiotensinogênio em angiotensina na circulação. A enzima conversora da angiotensina – ECA libera dois aminoácidos da angiotensina I convertendo-a em angiotensina II, a qual estimula a produção de aldosterona, cuja ação ocasiona o aumento de reabsorção sódio e de água nos túbulos glomerulares (GUYTON; HALL, 2002).

No organismo, a pressão arterial é controlada através do mecanismo “rim - líquidos corpóreos” e pelo “sistema renina-angiotensina”. Os medicamentos utilizados para controle de hipertensão podem ter ação de redução da reabsorção tubular de sal e água, sendo denominados de diuréticos; ou podem aumentar o fluxo renal através de uma ação vasodilatadora ou ainda exercer efeito bloqueador sobre o sistema “renina-angiotensina” (LAMEIRE *et al.*, 2005). Entre os fatores que causam a necrose tubular está a exposição a um crescente número de agentes nefrotóxicos ambientais e terapêuticos, como diversas classes de antibactericidas, antifúngicos, antivirais e antineoplásicos. Drogas que interferem com a auto-regulação do fluxo sanguíneo renal e glomerular podem provocar falhas agudas pré-renais. Esta auto-regulação ocorre em respostas a mudanças na pressão de perfusão renal, sendo um mecanismo regido

dentro de limites muito próximos. No caso de quedas na pressão renal ocorre uma dilatação gradual das arteríolas pré-glomerulares mediada pela geração no rim de produtos vasodilatadores da angiotensina, o ácido araquidônico (prostaglandina I_2) e de óxido nítrico. Na zona inferior de auto-regulação a manutenção da constante pressão capilar glomerular ocorre em função da vasoconstrição das arteríolas pós-glomerulares, principalmente sob ação da angiotensina II. (LAMEIRE *et al.*, 2005). Quadros de anúria aguda ou oligúria severa são indicadores específicos de falhas renais agudas, embora esta doença possa ocorrer com excreção de urina normal (HARDMAN; LIMBIRD, 1996; LAMEIRE *et al.*, 2005). Pacientes com doenças renais apresentam normalmente anemia e hipertensão. O sistema de controle da pressão arterial é muito sensível, pequenas alterações na pressão arterial originam um processo regulatório, que leva a um aumento na excreção urinária. (GUYTON; HALL, 2002). Outros estudos são necessários para avaliar uma possível correlação com o aumento de excreção urinária e aumento da ingestão de água demonstrado pelos animais do grupo A100 com o efeito hipotensivo relatado nos estudos de WATANABE *et al.*, (2002, 2003). Em 2002 estes autores relataram o efeito hipotensivo de *A. brasiliensis* em ratos espontaneamente hipertensos, e em um estudo posterior, em 2003 este cogumelo demonstrou um efeito similar em humanos levemente hipertensos (WATANABE *et al.*, 2003).

4.4.4 Análises de urina e de fezes

As características físico-químicas da urina dos grupos A100 e A50 estão apresentadas na Tabela 14. O resultado do exame parasitológico, do sangue oculto e de gordura fecal em fezes está apresentado na Tabela 15. Os resultados demonstrados permitem observar que não houve diferenças entre os animais tratados com o cogumelo, quando comparado ao grupo C, com exceção de dois parâmetros: o grupo A100 apresentou traços para proteína (mg.dL^{-1}) e o grupo A50 apresentou traços para pigmentos biliares. Para o grupo A50 foi também constatada a presença de corpos cetônicos em quantidades maiores do que no grupo C, e ainda, a presença de pequena quantidade de sangue oculto nas fezes.

TABELA 14 - Características físico-químicas em urina de 15 horas, proveniente de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.

ANÁLISES	Controle	A100	A50
Cor	Amarelo citrino	Amarelo citrino	Amarelo citrino
Aspecto	Límpido	Límpido	Límpido
Volume (mL)	3,2	5,3	2,8
Densidade	1.020	1.015	1.020
pH	6	6	6,5
Glicose (mg/dL)	-	-	-
Proteína (mg/dL)	-	Traços	-
Urobilinogênio	-	-	-
Pigmentos biliares	-	-	Traços
Bilirrubina (mg/dL)	-	-	-
Corpos cetônicos (mg/dL)	15	15	150
Nitritos	-	presentes	-
Eritrócitos (/mL)	<1.000	2.000	<1.000
Leucócitos (/mL)	1000	1.000	2.000
Cilindros	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Cristais	Fosfato triplo Fosfato amorfo	Fosfato triplo Fosfato amorfo	Fosfato triplo Fosfato amorfo

NOTA: n=20

TABELA 15 - Exame parasitológico, sangue oculto e gordura fecal de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.

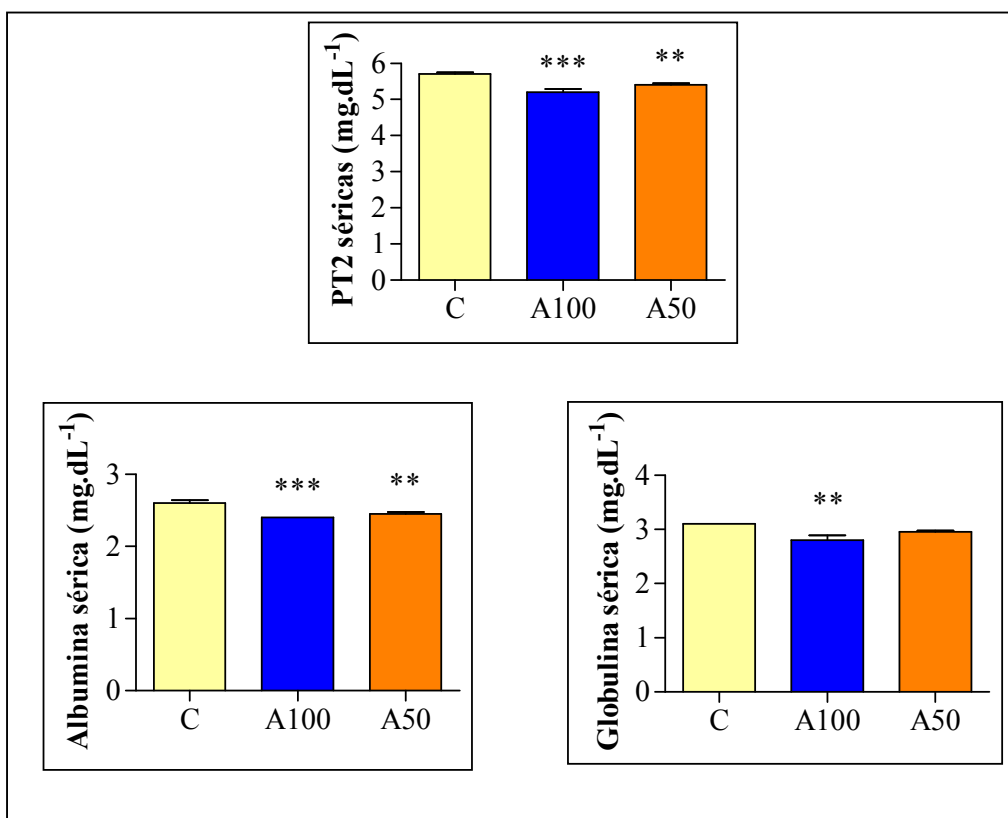
Análises		Tratamentos		
Ovos		C	A100	A50
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	-	-	-
	<i>Trichuris trichiura</i>	-	-	-
	<i>Ancilostomideo</i>	-	-	-
	<i>Taenia sp</i>	-	-	-
	<i>Enterobius vermicularis</i>	-	-	-
	<i>Hymenolepis nana</i>	-	1+	-
	<i>Schistosoma mansoni</i>	-	-	-
	<i>Trichostrongylus sp.</i>	-	-	-
Larvas rabditóides		-	-	-
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	-	-	-
Cistos		-	-	-
	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	-	-
	<i>Entamoeba coli</i>	-	-	-
	<i>Endolimax nana</i>	-	-	-
	<i>Entamoeba bütschlii</i>	-	-	-
	<i>Giardia lamblia</i>	3+	-	3+
	<i>Chilomastix mesnilli</i>	-	-	-
	<i>Sarcocystis hominis</i>	-	-	-
	<i>Isospora belli</i>	-	-	-
Sangue oculto		-	-	1+
Gordura fecal		-	-	-

NOTA: n=20

4.4.5 Metabolismo protéico

As concentrações plasmáticas de proteína total, albumina e globulina dos animais dos grupos C, A100, A50 estão apresentados na Figura 28. Ocorreu um decréscimo significativo nos valores das proteínas totais para os grupos A100 e A50, com valores de $5,2 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $5,4 \text{ mg.dL}^{-1}$, respectivamente, se comparados ao grupo C, que apresentou valor de $5,7 \text{ mg.dL}^{-1}$.

FIGURA 28 - Concentrações plasmáticas de proteína total (acima), albumina (à esquerda) e globulina (à direita) de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, sem S-180: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 10 camundongos por grupo tratado. ** $P < 0.01$ vs. C; *** $P < 0.001$ vs. C.

A concentração da albumina também apresentou decréscimo significativo nos grupos tratados com cogumelo, com valores de $2,4 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $2,45 \text{ mg.dL}^{-1}$ para A100 e A50, respectivamente, enquanto o grupo C apresentou valor de $2,6 \text{ mg.dL}^{-1}$. O

resultado obtido para a concentração de globulina nos animais tratados com *A. brasiliensis* apresentou diminuição significativa para o grupo A100, com valor de 2,8 mg.dL⁻¹, enquanto o grupo C apresentou valor de 3,1 mg.dL⁻¹, e para o grupo A50 foi detectado um valor de 2,95 mg.dL⁻¹.

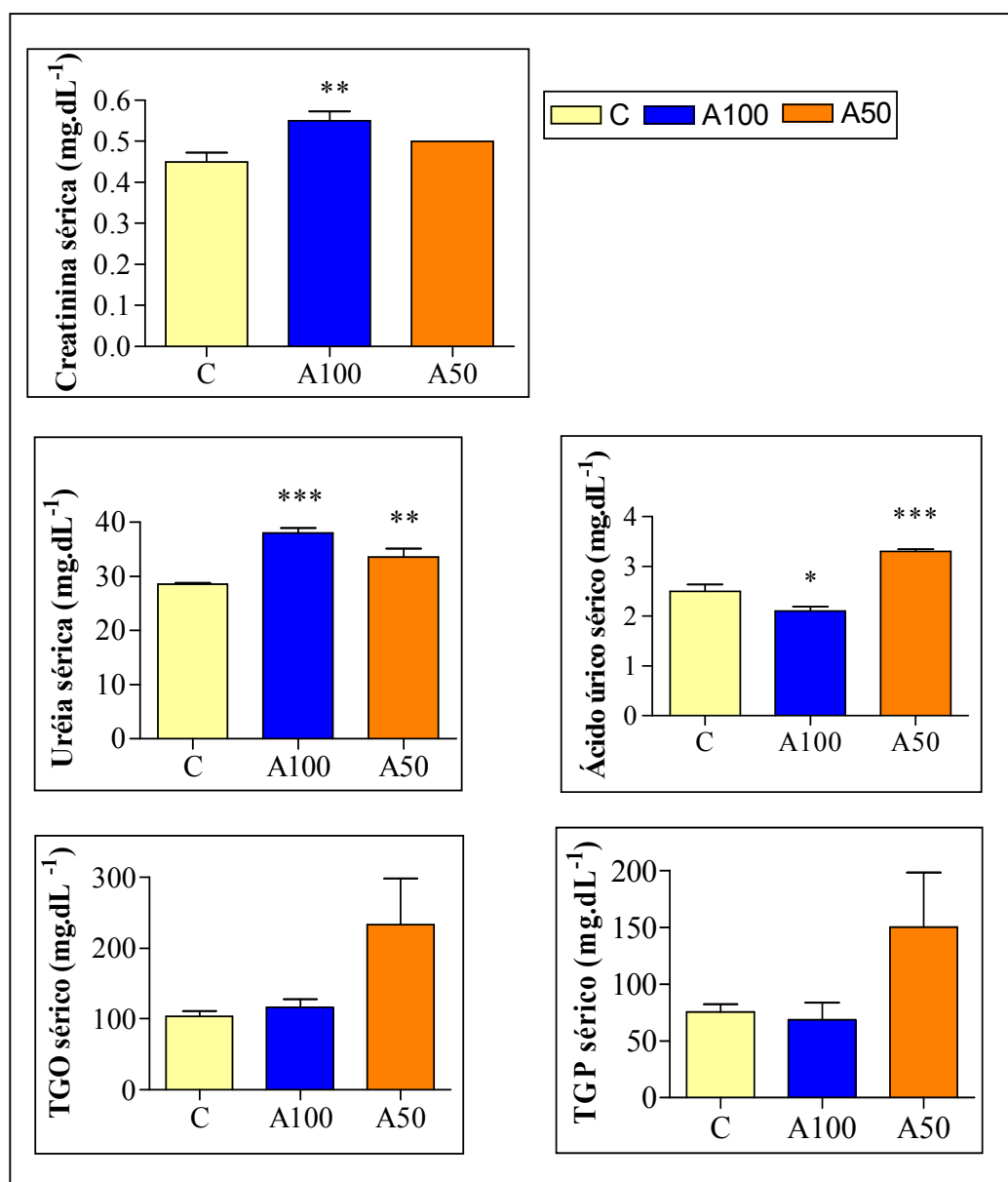
As concentrações plasmáticas de creatinina, uréia, ácido úrico, transaminase oxalacética - TGO e transaminase pirúvica - TGP estão apresentados na Figura 29. Os valores de creatinina aumentaram significativamente no grupo A100, que apresentou valor de 0,55 mg.dL⁻¹ e no grupo A50 foi de 0,5 mg.dL⁻¹, enquanto no grupo C foi de 0,45 mg.dL⁻¹. A concentração da uréia também apresentou aumentos significativos, com valores de 38,0 mg.dL⁻¹ e 33,5 mg.dL⁻¹ nos grupos A100 e A50, respectivamente, e de 28,5 mg.dL⁻¹ no grupo C. O ácido úrico apresentou alterações significativas nos grupos tratados: uma diminuição no grupo A100 (2,1 mg.dL⁻¹) e aumento no grupo A50 (3,3 mg.dL⁻¹), quando comparado ao C (28,5 mg.dL⁻¹). Os valores de TGO e TGP apresentaram aumentos substanciais nos grupos tratados com o cogumelo, entretanto, não houve diferença estatística em função da grande variância encontrada nas amostras do grupo A50.

A filtração sanguínea nos rins ocorre com reabsorção dos sais sódio, potássio, cloro, glicose, aminoácidos e água, originando o filtrado glomerular, que possui a mesma composição do plasma, entretanto, sem a presença de proteínas e de células, ou presentes em baixos níveis. A presença de grande quantidade de proteínas (proteinúria) ou de glicose (glicosúria) na urina é indicativa de problemas renais (STRASINGER, 2000). Desta forma, os traços de proteína (Tabela 14) encontrada na urina dos animais do grupo A100 e a ausência no grupo A50, são um indicativo de filtração glomerular eficiente e reabsorção tubular das proteínas. Adicionalmente a este dado, os valores negativos encontrados para a glicose na urina (Tabela 14) em todos os grupos sugerem ausência de danos renais.

Os valores normais para proteínas totais séricas para camundongos Swiss estão entre 4,8 a 6,6 mg.dL⁻¹ (ATTA *et al.*, 1981). Os valores apresentados pelos grupos A100 e A50, se comparados ao grupo C, resultaram em redução significativas na concentração de proteínas totais (albuminas e globulinas) no plasma sanguíneo (Figura

28), entretanto os valores estão dentro deste limite de normalidade. Assim, apesar de reduções nos níveis plasmáticos das proteínas totais geralmente estarem associadas com doenças renais ou hepáticas (LIMA *et al.*, 2003) é possível excluir esta possibilidade no presente estudo.

FIGURA 29 - Concentrações plasmáticas de creatinina, uréia, ácido úrico, TGO, TGP de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, sem S-180: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 10 camundongos por grupo tratado. * $P < 0.05$ vs. C; ** $P < 0.01$ vs. C; *** $P < 0.001$ vs. C.

A presença de raras células epiteliais (Tabela 14) está dentro dos parâmetros normais, assim como os valores encontrados para os leucócitos. A macrohematúria é caracterizada pela presença de altos valores de eritrócitos, e os valores encontrados neste estudo estão dentro do padrão de normalidade. Em casos de glomerulonefrites ocorre a presença de numerosos cilindros, leucócitos e hematúria (BIRCH *et al.*, 2001). Os cristais, quando presentes na urina, geralmente resultam de elementos normais dissolvidos, podendo ser resultantes do tipo de alimentação, não sendo indicativos de patologias. A ausência de cilindros corrobora com os indicativos encontrados de normalidade da função renal. O tempo de coleta de 15 horas para as amostras da urina foi longo, o que resultou na precipitação e presença dos cristais de fosfato, entretanto, este dado não é indicativo de anormalidade renal. Os corpos cetônicos na urina podem ser decorrentes da oxidação de lipídeos, tendo em vista o jejum de 15 h ao qual os animais foram submetidos durante a coleta das amostras de urina (BURTIS; ASHWOOD, 1998).

Falha renal aguda é um termo genérico para o decréscimo abrupto e contínuo na função renal resultante da retenção de resíduos nitrogenados (uréia e creatinina) e não nitrogenados (LAMEIRE *et al.*, 2005). O aumento no catabolismo protéico e/ou redução da eliminação renal ocasionam aumentos nos valores de uréia. A perda do ácido fosfórico a partir da fosfocreatina muscular forma a creatina, cujo anidrido é a creatinina. Os rins excretam creatinina de forma constante, não dependendo do volume urinário eliminado ou da ingestão de proteínas via alimentação. O aumento nos teores de creatinina ocorre na insuficiência renal, após o aumento nos valores de uréia. A creatinina sérica é uma das formas mais utilizadas para estimar a filtração glomerular, representando uma ótima maneira de mensurar a função renal. Uma queda na filtração glomerular precede o aparecimento de sintomas de falência renal em todas as formas de doença renal progressiva, de modo que o seu monitoramento permite estimar o ritmo de perda da função renal, predizer riscos de complicações nas doenças renais e proporcionar o ajuste adequado de medicação em pacientes (PECCOITS-FILHO, 2004). O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas no homem, sendo que aumentos da uricemia ocorrem por redução da excreção renal ou pelo excesso de

sua produção. A excreção urinária elevada do ácido úrico pode ocasionar a precipitação de uratos nos espaços intersticiais do rim, levando a um processo úrico nefrótico, ou a uma litíase renal, e estes fatores podem contribuir em quadros de insuficiência renal (STRASINGER, 2000). Valores aumentados de ácido úrico são observados na insuficiência renal e pode preceder o aumento de uréia sanguínea, podendo também ocorrer no jejum prolongado. As concentrações plasmáticas de uréia, creatinina e ácido úrico permaneceram dentro do padrão de normalidade nos grupos estudados, sugerindo ausência de danos renais.

O teste de nitrito positivo requer a presença de nitratos na urina, bactérias em quantidades suficientes capazes de converter nitratos em nitritos e condições adequadas, isto é, tempo suficiente para que essa conversão ocorra (SATOL *et al.*, 2005). O longo tempo de coleta da urina nas gaiolas metabólicas (15 horas) pode ter propiciado as condições para a presença de nitritos na urina dos animais.

O NO, por ser um radical livre, se une ao oxigênio, originando dois produtos principais que são os nitritos (NO_2) e nitratos (NO_3). O NO possui papel essencial na regulação das funções de diversos sistemas - cardíaco, nervoso, muscular, imune e arterial, onde tem atuação sobre a taxa de filtração glomerular (GRF). Uma diminuição de NO produz uma maior reabsorção de sódio, o que produz um aumento do fluxo sanguíneo, favorecendo a aparição da hipertensão arterial essencial (BRENNER; LEVINE, 2004; CHANGO *et al.*, 2005; TELLES FILHO, 2005). Experimentos com camundongos demonstraram uma redução na produção de O_2^- que resultou em um alto fluxo sanguíneo renal, com excreção urinária de nitritos/nitratos, indicando um aumento da bio-disponibilidade do NO (HAQUE; MAJID, 2004). A presença de nitritos nas amostras analisadas dos grupos A100 e A50 podem estar relacionados com este mecanismo.

A bilirrubina e o urobilinogênio são produtos derivados do metabolismo da hemoglobina no fígado e são eliminados via urina quando ocorre hemólise ou hepatopatias. Níveis elevados de bilirrubina, em geral, indicam algum dano hepático, assim como um baixo nível de albumina serológica (proteína do sangue) (GUYTON; HALL, 2002). As análises das concentrações de proteínas totais, de globulina e

albumina plasmáticas também demonstraram uma redução significativa para estes parâmetros, e embora tenha dado diferença estatística entre os grupos A100 e A50 se comparados ao grupo C, os valores encontrados para todos os grupos permanecem dentro do limite da normalidade (Figura 28). A ausência de bilirrubina no grupo A100 pode ser um indicativo de normalidade da função hepática. Entretanto, a presença dos traços de pigmentos biliares detectados na urina do grupo A50 deve ser pesquisada com maior cuidado a fim se comprovar ausência de danos ao fígado.

Em fevereiro de 2006 o Ministério da Saúde, do Trabalho e do Bem-Estar (MHLW) do Japão, anunciou a saída do mercado de um produto à base de agaricus produzido na china e comercializado pela empresa Kirin Well-Foods Co., Ltda, baseada na confirmação de que o referido produto poderia causar danos ao fígado e estímulos ao surgimento de câncer. O MHLW tomou esta decisão baseada no resultado de testes de toxicidade realizados com ratos pelo Laboratório Nacional de Pesquisas Sanitárias de Produtos Alimentícios e Farmacêuticos (National Institute of Health Sciences - NIHS). A condução dos testes foi realizada com três produtos diferentes que são fabricados por método de produção distinta. Segundo o NIHS, apenas o produto de origem chinesa da Kirin Well-Foods Co, apresentou problemas, quanto aos outros dois produtos, não havia sido constatada a existência de efeitos colaterais sobre o fígado (BOLETIM DE MERCADO, 2006).

Com a finalidade de detectar possíveis efeitos colaterais foi realizado estudo de toxicidade subcrônica em ratos com *A. brasiliensis*, e não foram observadas alterações relacionadas a compostos tóxicos nas medidas hematológicas, no peso dos órgãos e observações histo-patológicas. As doses variaram de 0 a 5% de extrato aquoso durante 90 dias e não ocorreu nenhuma mudança importante de modo geral, nem mortes em nenhum dos grupos testados (KUROIWA *et al.*, 2005). Além disso, outros estudos com agentes cancerígenos foram realizados em ratos e verificou-se que o cogumelo *A brasiliensis* apresentou atividade antimutagênica quando administrado na forma de extrato aquoso na fase de pré-indução, mas não na fase pós-indução (DELMANTO *et al.*, 2001; BARBISAN *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002; BARBISAN *et al.*, 2003). Já a administração do corpo frutífero moído a 10% na ração de ratos propiciou o efeito

antimutagênico mesmo na fase pós-iniciação, o que sugere a presença de compostos ativos que não são extraídos na forma de preparo do extrato aquoso (PINHEIRO *et al.*, 2003).

Neste estudo de toxicidade subcrônica de KUROIWA *et al.*, foi verificado um pequeno aumento significativo no nível sérico de nitrogênio uréico em machos, nos grupos com doses de 2,5% e 5%, entretanto, não foi observada nenhuma alteração histo-patológica correlacionada nos rins; entretanto, a redução nas concentrações de creatinina sérica sugere que este aumento da uréia teve um pequeno efeito toxicológico significativo (KUROIWA *et al.*, 2005). Em nossos experimentos também foram verificados aumentos plasmáticos significativos para a creatinina e uréia nos grupos A100 e A50, e também de ácido úrico para o grupo A50, e neste caso, uma diminuição deste parâmetro no grupo A100 (Figura 29). Assim, não é possível excluir algum efeito tóxico do cogumelo na concentração de 29% no grupo A100 e 14,5% par ao grupo A50 oferecida aos animais neste tratamento, entretanto são necessárias novas pesquisas para averiguar esta hipótese. Segundo os estudos de Kuroiwa *et al.*, o extrato, mesmo na dose de 5% na dieta, (2654 mg.Kg⁻¹ peso corporal dia) não causou efeitos importantes nos ratos, de modo que a dose sem efeitos adversos observados (NOAEL– *No-Observed-Adverse-Effect-Level*) foi estabelecida em a dose estipulada em 55 mg.Kg⁻¹ peso corporal dia na dieta (KUROIWA *et al.*, 2005).

No presente experimento foram observados aumentos sem diferenças estatísticas nos valores de TGO e TGP para o grupo A50 (Figura 29). Níveis das transaminases TGO e TGP acima do normal podem indicar algum dano hepático, mas não necessariamente, pois elevações nas concentrações destas enzimas hepáticas ocorrem também na presença de drogas ou remédios, como os hipolipidemiantes para controle do colesterol, a estatina. Nestes casos, considera-se que aumentos de três vezes ou mais nos valores normais de TGO e TGP são o limite para suspensão de uso deste medicamento (BERTOLAMI, 2005). No presente trabalho, os níveis do grupo A50 foram numericamente o dobro, estando dentro do limite aceitável. Assim, como foi verificada uma diminuição nos níveis de colesterol total e de LDL-colesterol de 16% e 30%, respectivamente, e aumento nos valores de HDL de 115% para o grupo

A50 (Figura 33), as alterações das enzimas hepáticas TGO e TGP podem estar correlacionadas com a ação de algum princípio ativo, possivelmente estatina, presente no micélio do cogumelo.

Os resultados dos exames parasitológicos apresentados na Tabela 15 evidenciam um bom estado de saúde dos animais utilizados neste estudo. A ausência de gordura fecal é indício de ausência de patologia de má absorção (GOODMAN; GILMAN, 1996).

O exame de sangue oculto em fezes permite correlacionar estados de doenças no colo do intestino, como câncer, pólipos ou outras alterações, na maioria dos casos (BRASIL, 2003). O resultado de pequenas quantidades encontrado no grupo A50 deve ser melhor investigado, pois pode representar a presença de alguma patologia que pode estar correlacionada com o cogumelo *A. brasiliensis*, mas provavelmente pode ter sido em função da presença de vitaminas administrado na forma de suplemento. Este tipo de exame deve ser realizado sem ingestão prévia durante três dias de remédios como aspirina, algumas carnes e vitaminas, especialmente do tipo C e ferro (BRASIL, 2003; WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION, 2006).

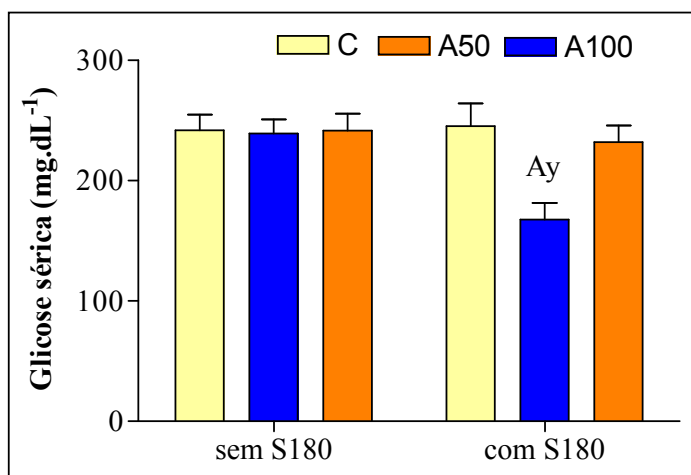
4.4.6 Metabolismo glicídico

As concentrações plasmáticas de glicose dos animais dos grupos C, A100, A50, C-S, A100-S e A50-S estão apresentados na Figura 30. Entre os grupos C, A100 e A50 não foram observados diferenças, com os seguintes valores $241,80 \text{ mg.dL}^{-1}$, $239,30 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $241,57 \text{ mg.dL}^{-1}$. Ocorreu um decréscimo significativo para o grupo A100-S, com $167,7 \text{ mg.dL}^{-1}$, se comparado ao C-S, com $241,8 \text{ mg.dL}^{-1}$, e também se comparado ao grupo A100 (indicado pela letra y no gráfico). O grupo A50-S apresentou uma diminuição não significativa nos valores da glicose plasmática, com $232,1 \text{ mg.dL}^{-1}$, quando comparado ao A50.

Entretanto, como os valores de glicose plasmática não diminuíram no grupo C-S, quando comparado ao grupo C, observa-se que o S-180 não induziu a caquexia dos animais. Portanto, a diminuição da concentração plasmática de glicose nos animais do

grupo A100-S possivelmente deve-se a interação dos compostos bioativos do cogumelo, e não devido à presença do Sarcoma.

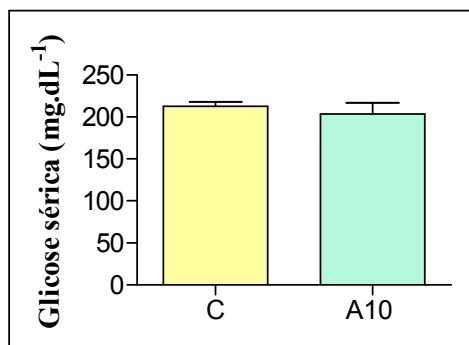
FIGURA 30 - Concentrações plasmáticas de glicose de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média \pm erro padrão de 10 camundongos por grupo tratado. ^A $P < 0,05$ vs. C S-180; ^y $P < 0,05$ vs. A100 sem S-180.

As concentrações plasmáticas de glicose dos animais dos grupos C e A10 estão apresentadas na Figura 31. Os valores foram de 212,5 83 mg.dL⁻¹ e de 203,7 83 mg.dL⁻¹, para os grupos C e A10, respectivamente. Estes dados resultaram ausência de diferença estatística ($P > 0,05$), mas indicam uma tendência de redução nos valores de glicose para os animais que ingeriram 2,9% de micélio de *A. brasiliensis*.

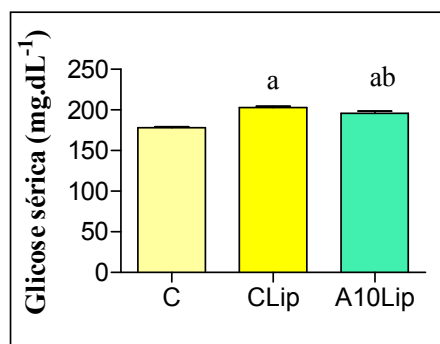
FIGURA 31 - Concentrações plasmáticas de glicose de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A10- ração com 2,9% de micélio, C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 7 animais no grupo C.

As concentrações plasmáticas de glicose dos animais dos grupos C, CLip e A10Lip estão apresentados na Figura 32, que apresentaram valores de 178,2 mg.dL⁻¹, 202,8 mg.dL⁻¹ e 195,8 mg.dL⁻¹, respectivamente. A presença de lipídeos ocasionou um pequeno aumento nos valores de glicose plasmática, entretanto sem diferenças estatísticas ($P>0,05$). Novamente a presença do cogumelo indica uma tendência de redução nos valores de glicose, mesmo na presença de lipídeos a 5% na dieta, no grupo A10Lip, se comparado ao grupo CLip.

FIGURA 32 - Concentrações plasmáticas de glicose de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A10- ração com 2,9% de micélio, C - ração sem adição de cogumelo. grupos A10 Lip e C Lip – respectiva ração com suplementação de 5% de lipídeos saturados.



NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 6 animais no grupo C, e de 7 animais nos grupos CLip e A10Lip. ^a $P<0,05$ vs. C; ^b $P<0,05$ vs. CLip.

A redução nos níveis de glicemia plasmática encontrada no grupo A100-S, e tendência de redução no grupo A10 é um dado importante quando relacionado com a ocorrência de diabetes. A participação das moléculas de β -glicanas e oligosacarídeos obtidas do corpo de frutificação de *A. brasiliensis* foram testadas e ocasionaram uma redução na glicose sérica de ratos (KIM *et al.*, 2005). Estes autores sugerem que este cogumelo possui atividade antidiabética pela promoção de liberação de insulina pelas células de Langerhans no pâncreas, entretanto esta hipótese necessita ser testada.

Popularmente este cogumelo tem sido utilizado para tratamento de várias doenças, inclusive diabetes (PROVITAS, 2005; OBJECTIS, 2005). Outros cogumelos demonstraram efeitos semelhantes, o extrato de *Agaricus bisporus*, *Agrocybe aegerita* e *Cordyceps sinensis*, *Auricularia auricula-judae*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus*

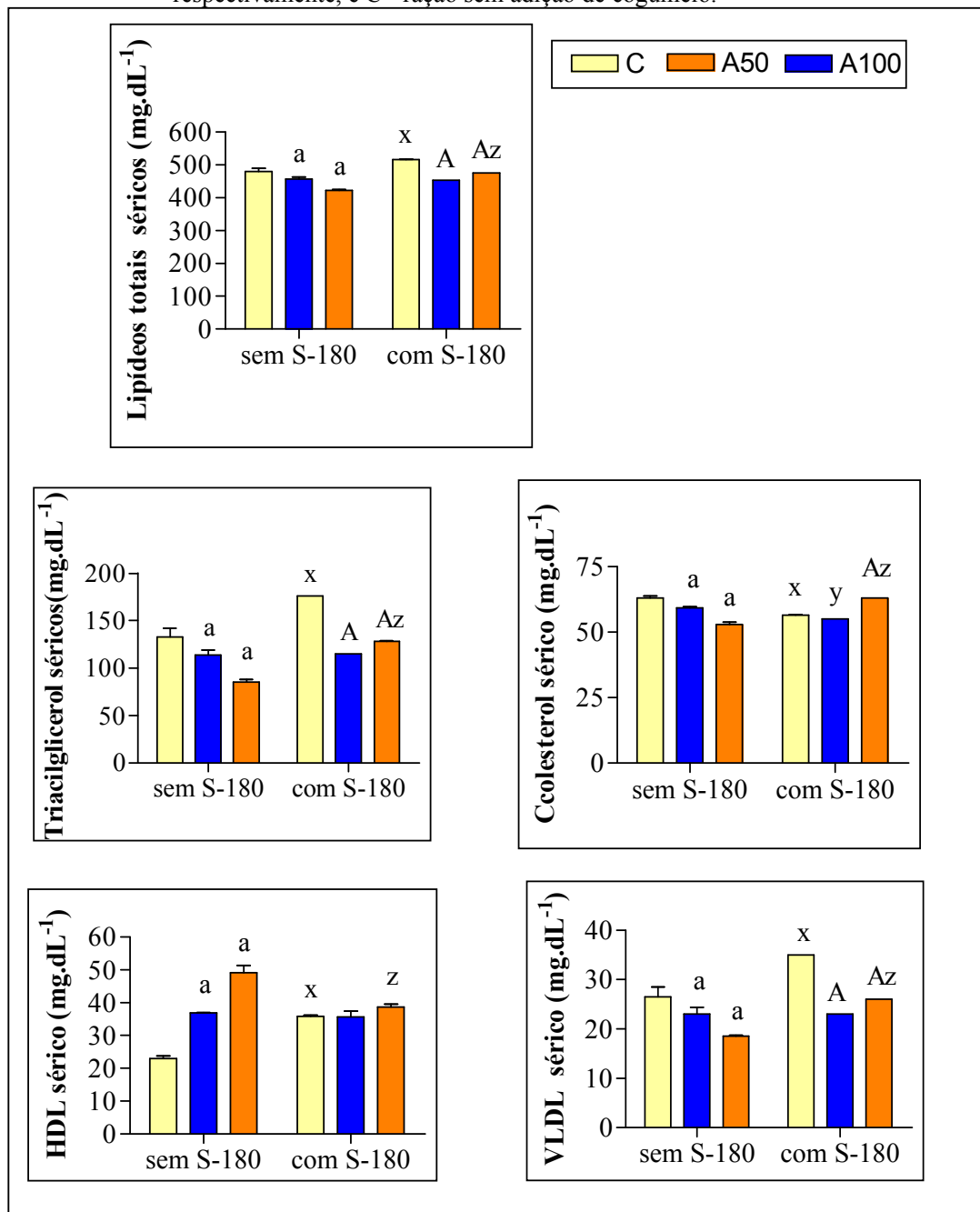
ostreatus, *Phellinus linteus*, *Ganoderma lucidum* e *Tremella aurantia* também propiciaram diminuição nos níveis séricos de glicose. E ainda, os três primeiros cogumelos citados apresentaram atividade hipoglicêmica comprovada em diabetes dependente de insulina, e sua ação foi correlacionada com a presença dos polissacarídeos (HIKIMO *et al.*, 1989; KIHO *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 1997; YUAN *et al.*, 1998; GUNDE-CIMERMAN; 1999; KIM *et al.*, 2001). A diabetes, caracterizada pelo aumento de níveis de glicose na circulação sanguínea, ocasiona vários efeitos deletérios sobre órgãos do organismo. Atualmente existem 171 milhões de diabéticos; com aplicação de 5% das despesas de saúde pública a nível mundial, sendo que 3,2 milhões de mortes por ano são atribuídas à diabetes e segundo projeções da OMS, a diabetes pode tornar-se uma grande epidemia até 2030 (BIOMED, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Desta maneira, a prevenção, estacionamento ou regressão na taxa de progressão da diabetes é um objetivo mundial.

4.4.7 Metabolismo lipídico

Os parâmetros relacionados ao metabolismo lipídico, com as concentrações plasmáticas de lipídeos totais, colesterol total, triacilglicerol, HDL-colesterol e VLDL-colesterol dos animais dos grupos C, A100, A50, C-S, A100-S e A50-S estão apresentados na Figura 33.

Os valores para lipídeos totais apresentaram um decréscimo significativo, para os grupos A100 e A50 (457,25 mg.dL⁻¹ e 422,0 mg.dL⁻¹), se comparados ao grupo C (480,0 mg.dL⁻¹); o mesmo ocorreu para os grupos A100-S e A50-S (454,00 mg.dL⁻¹ e 475,5 mg.dL⁻¹), quando comparado ao grupo C-S (516,5 mg.dL⁻¹). A comparação entre os grupos sem S-180 com os respectivos grupos na presença do S-180 resultou em aumento significativo entre os grupos C e C-S, e entre A50 e A50-S, representados por x e z, respectivamente no gráfico.

FIGURA 33 - Concentrações plasmáticas de lipídeos totais, triacilgliceróis, colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média \pm erro padrão de 10 camundongos por grupo tratado. ^a $P < 0,05$ vs. C sem S-180; ^A $P < 0,05$ vs. C S-180; ^x $P < 0,05$ vs. C sem S-180; ^y $P < 0,05$ vs. A100 sem S-180; ^z $P < 0,05$ vs. A50 sem S-180.

Os triacilgliceróis plasmáticos apresentaram diminuição significativa que representou 14% e 36% nos grupos A100 e A50, respectivamente, com valores de

114,00 mg.dL⁻¹ e 85,0 mg.dL⁻¹, respectivamente, se comparados ao grupo C (133,0 mg.dL⁻¹). Observou-se redução significativa representada por 35% e 27% no grupo A100-S e A50-S, respectivamente, com valores de 115,00 mg.dL⁻¹ e 128,5 mg.dL⁻¹, respectivamente, se comparados ao grupo C-S (176,0 mg.dL⁻¹). Na presença do S-180, verificou-se um aumento significativo nos grupos C-S e A50-S, se comparados aos seus respectivos grupos sem S-180.

O colesterol plasmático diminuiu significativamente, e representou 6% e 16%, aproximadamente, nos grupos A100 e A50, respectivamente, com valores de 59,25mg.dL⁻¹ e 53,0 mg.dL⁻¹, respectivamente, se comparados ao grupo C (63,0 mg.dL⁻¹). Um aumento significativo do colesterol ocorreu no grupo A50-S, que representou 11,5% (63,0 mg.dL⁻¹), se comparado ao C-S (56,5 mg.dL⁻¹) e ao grupo A100-S (55,0 mg.dL⁻¹). Na presença do S-180, verificou-se uma diminuição significativa nos grupos C-S e A100-S, se comparados aos seus respectivos grupos sem S-180, C e A100 e um aumento significativo no grupo A50-S, quando comparado ao grupo A50.

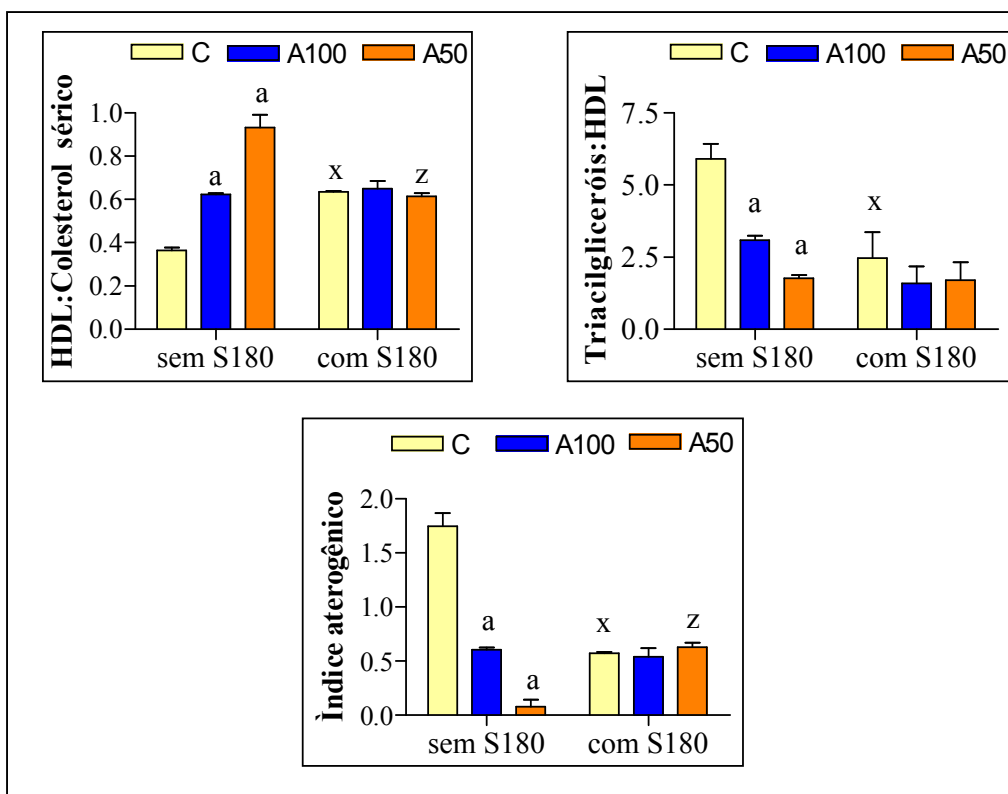
Os valores do HDL-colesterol apresentaram aumentos significativos, representados por 61% e 115%, aproximadamente, nos grupos A100 e A50, respectivamente, com valores de 36,87 mg.dL⁻¹ e 49,16 mg.dL⁻¹, respectivamente, se comparados ao grupo C (22,95 mg.dL⁻¹). Os valores do HDL-colesterol não apresentaram alterações significativas ($P>0,05$) na comparação entre os grupos com S-180; observou-se um aumento e representou 8% no grupo A50-S (38,7 mg.dL⁻¹), se comparado ao C-S (35,9 mg.dL⁻¹) e ao grupo A100-S (35,7 mg.dL⁻¹). Na presença do S-180, verificou-se um aumento significativo no grupo C-S, e um decréscimo significativo no grupo A50-S, se comparados aos seus respectivos grupos sem S-180, C e A50.

Os valores de VLDL-colesterol plasmáticos apresentaram diminuição significativa, e representou 13% e 30% nos grupos A100 e A50, respectivamente, com valores de 23,00 mg.dL⁻¹ e 18,5 mg.dL⁻¹, respectivamente, se comparados ao grupo C (26,5 mg.dL⁻¹). Ocorreu um decréscimo significativo representado por 34% e 25% nos grupos A100-S e A50-S, respectivamente, com valores de 23,00 mg.dL⁻¹ e 26 mg.dL⁻¹,

respectivamente, se comparados ao grupo C-S (35 mg.dL^{-1}). Na presença do S-180, verificou-se um aumento significativo no grupo C-S e A50-S, se comparados aos seus respectivos grupos sem S-180, C e A50.

A razão HDL:colesterol plasmático, razão triacilgliceróis :HDL-colesterol plasmático e índice aterogênico dos animais dos grupos C, A100, A50, C-S, A100-S e A50-S estão apresentados na Figura 34.

FIGURA 34 - Relação HDL:colesterol plasmático, razão triacilgliceróis:HDL e índice aterogênico de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média \pm erro padrão de 10 camundongos por grupo tratado. ^a $P < 0,05$ vs. C sem S-180; ^x $P < 0,05$ vs. C sem S-180; ^z $P < 0,05$ vs. A50 sem S-180.

A relação HDL:colesterol plasmático apresentou um aumento significativo representado por 71% e 156%, nos grupos A100 e A50, respectivamente, com valores de 0,62 e 0,93, respectivamente, se comparados ao grupo C (0,36). Na presença do S-180 não ocorreu alteração na relação HDL:colesterol entre os grupos tratados, A100-S

e A50-S (0,65 e 0,61, respectivamente), se comparado ao C-S (0,64). E ainda, na comparação entre grupos com e sem S-180 verificou-se um aumento significativo no grupo C-S, e um decréscimo significativo no grupo A50-S, se comparados aos seus respectivos grupos sem S-180, C e A50.

A relação triacilgliceróis:HDLcolesterol plasmático apresentou uma redução significativa representada por 48% e 70%, nos grupos A100 e A50, respectivamente, com valores de 3,09 e 1,77, respectivamente, se comparados ao grupo C (5,90). Na presença do S-180 ocorreram reduções de 35% e 30%, entretanto sem diferenças significativas entre os grupos A100-S e A50-S (1,59 e 1,70, respectivamente), se comparado ao C-S (2,47) ($P>0,05$). E ainda, na comparação entre grupos com e sem S-180 verificou-se uma redução significativa no grupo C-S, quando comparado ao C.

O índice aterogênico apresentou um decréscimo significativo representado por 65% e 96%, nos grupos A100 e A50, respectivamente, com valores de 0,61 e 0,08, respectivamente, se comparados ao grupo C (1,75). Na presença do S-180 não ocorreu alteração significativa no índice aterogênico entre os grupos tratados, A100-S e A50-S (0,54 e 0,63, respectivamente), se comparado ao C-S (0,57). Na presença do S-180, verificou-se um decréscimo significativo no grupo C-S, e um aumento significativo no grupo A50-S, se comparados aos seus respectivos grupos sem S-180, C e A50.

O metabolismo lipídico normalmente mantém um equilíbrio entre biossíntese e degradação. Quando o equilíbrio é perdido podem ocorrer hiperlipidemia, como hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Isto causa uma série de doenças graves, como a arteriosclerose, hipertensão, obesidade, diabetes, depressão funcional de alguns órgãos (LEE *et al.*, 2005). Hipercolesterolemia é considerada um importante fator de risco nas doenças arteriais coronárias. As estatinas, metabólitos secundários dos cogumelos, inibem seletivamente hidroximetil glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, a primeira enzima que participa na biossíntese do colesterol. Os pesquisadores de Merck Sharp & Dohme foram capazes de isolar a lovastatina de *Aspergillus terreus* e desta forma introduziram o primeiro inibidor da HMG-CoA redutase no mercado clínico (HOLME, 1995). Cogumelos comestíveis vêm sendo utilizados e apregoados como alimentos ideais para a prevenção de aterosclerose

devido ao seu alto conteúdo de fibras, proteínas e microelementos e baixo conteúdo de gorduras. O efeito hipocolesterolêmico do micélio e do corpo de frutificação de diversos cogumelos tem sido documentado, como de *Auricularia auricula-judae* e *Tremella fuciformis* (CHEUNG, 1996a,b), *Polyporus confluent* (SUGIYAMA *et al.*, 2000) *Grifola frondosa* (KABIR; YAMAGUCHI; KIMURA, 1987; KUBO; NANBA, 1996; 1997) e *Pleurotus ostreatus* (OPLETAL *et al.*, 1997; GUNDE-CIMERMAN e PLEMENITAS, 2001; BOBEK; OZDIN; KUNIAK, 1996; BOBEK; GALBAVY, 1999), *Volvariella volvacea* (CHEUNG, 1998), *Lentinus edodes* (KABIR; YAMAGUCHI; KIMURA, 1987; SUGIYAMA; YAMAKAWA; SAEKI, 1997).

A redução significativa nos valores de lipídeos totais, colesterol-total triacilgliceróis, LDL-colesterol e índice aterogênico, assim como um aumento para o HDL-colesterol e da razão HDL-colesterol:colesterol total foi constatado para os animais normais dos grupos A100 e A50, na ausência do S-180. A dosagem de 14,5% de micélio, recebido pelo grupo A50, resultou em maior redução das concentrações dos parâmetros lipídicos e maior aumento no HDL-colesterol. É possível que a redução nos parâmetros lipídicos ocorrido no grupo A100 tenha sido de menor intensidade, se comparado ao grupo A50, devido a uma superexposição dos receptores envolvidos aos compostos bioativos, o que pode ter ocasionado um efeito neutralizador ou mesmo contrário, em um mecanismo semelhante ao que ocorre na presença de altas doses de uma mesma droga ou remédio no organismo (GREENLAND; ROBINS, 1994).

Numerosas pesquisas apontam que concentrações elevadas de colesterol total ou de LDL-colesterol no plasma constituem importante fator de risco para o desenvolvimento de eventos ateroscleróticos. A relação de redução de 1 mg.dL⁻¹ de colesterol das LDLs no plasma possibilita redução de até 2% no índice de mortalidade por cardiopatia aterosclerótica (LAW; WALD; THOMPSON, 1994). Desta forma, é possível estimar que os animais do grupo A50 tiveram uma redução de 16% no risco de morte por problemas cardiovasculares.

Os dados obtidos em nosso estudo, com redução nos diversos parâmetros lipídicos corroboram os resultados obtidos em outras pesquisas, onde a ingestão oral

do corpo de frutificação e do micélio de *A. brasiliensis* adicionado com ácido γ -aminobutírico ocasionou uma redução na concentração sérica do colesterol total e triacilgliceróis em ratos, com aumentos no índice aterogênico (WATANABE *et al.*, 2002). As β -glicanas e oligosacarídeos obtidas do corpo de frutificação de *A. brasiliensis* também resultaram em decréscimos na concentração sérica do colesterol total, triacilgliceróis e no fator de risco de problemas cardiovasculares em ratos, com concomitante aumento no HDL (KIM *et al.*, 2005). Este efeito redutor nas concentrações dos lipídeos totais, colesterol-total e dos triacilgliceróis também foi observada em coelhos, após a ingestão do extrato de *A. brasiliensis* (ITO, 2004). Observando-se estes resultados e comparando-os com os apresentados neste trabalho, verifica-se que o cogumelo, tanto na forma de extrato do corpo de frutificação, como os polissacarídeos ou seu produto hidrolisado, os oligossacarídeos, resultaram em interferência no metabolismo lipídico.

O mecanismo da ação hipolipidêmica dos cogumelos não está totalmente elucidado, entretanto, várias moléculas presentes podem estar envolvidas na diminuição do colesterol, como as fibras, que podem interferir na absorção do colesterol e reciclagem dos ácidos biliares, enquanto componentes lipofílicos podem afetar a síntese do colesterol. Em nosso estudo, a quantidade de fibras presentes no trigo e no material cultivado por *A. brasiliensis* foi de 2,7% e 3,8%, respectivamente, assim, é possível que a presença destas fibras possam ter participado no efeito hipolipidêmico detectado para os dois grupos. O micélio de *A. brasiliensis* possui em média 7,1% a 26,4%% de fibras (HUANG *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2001). Em outra pesquisa realizada com as fibras do cogumelo *Agaricus bisporus* foi verificado uma redução no colesterol total sérico pelo incremento no RNAm dos receptores do LDL hepático. A redução do colesterol total sérico ocorreu em todas as frações como HDL, VLDL, IDL e LDL dos ratos alimentados com uma dieta livre de colesterol (50 g.Kg⁻¹ fibras do cogumelo *Agaricus bisporus*) (FUKUSHIMA *et al.*, 2000).

É possível que os polissacarídeos presentes no micélio do cogumelo também tenha interferido no metabolismo lipídico dos animais dos grupos A100 e A50, pois em estudo realizado com o exopolissacarídeo de *Auricularia polytricha* em ratos foi

detectado uma redução de 70%, 27% e 24% nos níveis séricos de LDL, colesterol total e triacilgliceróis, respectivamente (YANG *et al.*, 2002). O polissacarídeo isolado a partir do cultivo de *Hericium erinaceus* por fermentação submersa ocasionou efeito hipolipidêmico em ratos hiperlipidêmicos, demonstrando assim que esta molécula também atua sobre o metabolismo lipídico (YANG; PARK; SONG, 2003).

Um comportamento semelhante foi constatado para os animais tratados com o cogumelo A100-S e A50-S, se comparados ao grupo C-S: a redução dos lipídeos totais, triacilgliceróis, e dos valores do VLDL-colesterol. O colesterol plasmático aumentou no grupo A100-S, e ainda, os valores do HDL, da razão HDL-colesterol:colesterol total e índice aterogênico não apresentaram diferenças se comparados ao C-S.

A presença do S-180 aumentou significativamente as concentrações dos parâmetros lipídicos no grupo C-S se comparado ao grupo C: lipídeos totais, triacilgliceróis, e dos valores do HDL e VLDL, e ainda a razão HDL-colesterol:colesterol total; e ocorreu um decréscimo para o colesterol total e para o índice aterogênico. A presença do cogumelo nos grupos com S-180 conseguiu inibir o aumento dos lipídeos totais, triacilgliceróis e do VLDL para o grupo A100-S, e do VLDL para o grupo A50-S.

Os resultados apresentados pelos grupos A100-S e A50-S podem estar relacionados com a presença dos compostos bioativos, como as fibras, polissacarídeos e também do ácido linoléico. Os ácidos conjugados linoléicos (Conjugated Linoleic Acid -CLA) modulam as funções do sistema imune, com atividade antitumoral, ao mesmo tempo em que removem o colesterol e reduzem aterosclerose aórtica (NUMATA; ISODA, 1986; MCLEOD *et al.*, 2004; O'SHEA; BASSAGANYA-RIERA; MOHED, 2004; FIELD; SCHLEY, 2004). Dados da literatura relatam a presença de 70-78% de ácidos linoléico do total dos ácidos graxos insaturados presentes no cogumelo *A. brasiliensis* (MIZUNO, 1989; MIZUNO *et al.*, 1998; ZHONG *et al.*, 1999; SHIBATA; DEMIATE, 2003). Desta forma, é possível que a presença de ácidos linoléicos presentes no cogumelo possam ter tido efeito somatório na atividade hipocolesterolêmica do *A. brasiliensis*.

Os parâmetros relacionados ao metabolismo lipídico, com as concentrações plasmáticas de lipídeos totais, colesterol total, triacilglicerol, HDL-colesterol e VLDL-colesterol, relação HDL:colesterol plasmático e índice aterogênico dos animais dos grupos C e A10 estão apresentados na Figura 35.

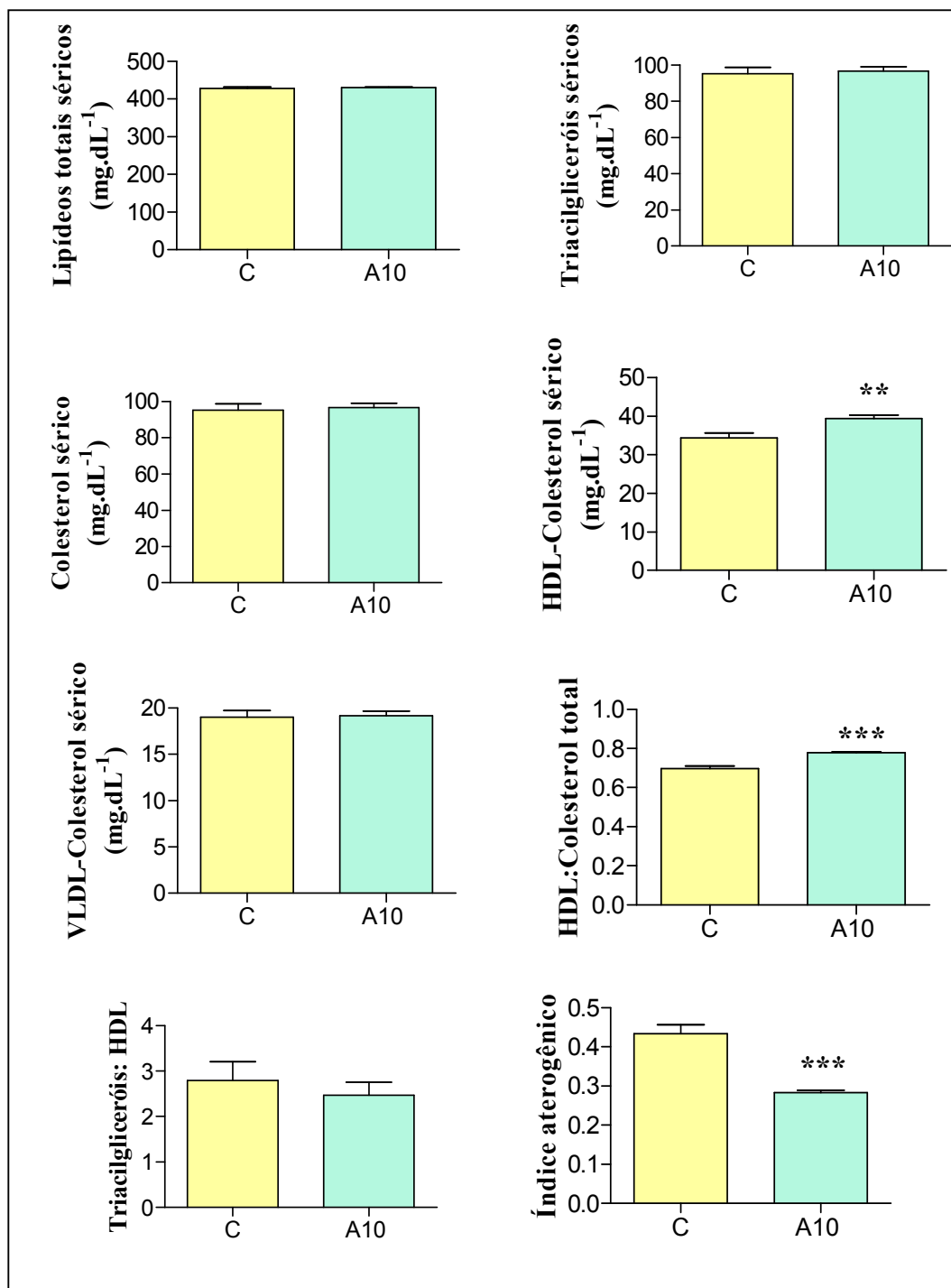
Os valores para lipídeos totais não apresentaram alterações significativas para os grupos C e A10 (428,17 mg.dL⁻¹ e 431,17 mg.dL⁻¹);

Os triacilgliceróis plasmáticos não apresentaram diferença significativa entre o grupo A10 (93,5 mg.dL⁻¹), se comparado ao C (95,00 mg.dL⁻¹).

O colesterol plasmático não apresentou alterações significativas entre os grupos C e A10, com valores de 49,17 mg.dL⁻¹ e 50,5 mg.dL⁻¹, respectivamente, assim como para VLDL-colesterol plasmáticos, que permaneceram com os mesmo valores entre os dois tratamentos, C e A10 (19,0 mg.dL⁻¹ e 19,17 mg.dL⁻¹, respectivamente).

Os valores do HDL-colesterol apresentaram aumentos significativos ($P<0,001$), representados por 13%, aproximadamente, para o grupo A10, se comparado ao grupo C, com 39,33 mg.dL⁻¹ e 34,33 mg.dL⁻¹, respectivamente. Este dado ocasionou também uma redução significativa representada por 10% na relação HDL:colesterol plasmático entre os grupos C e A10, com valores de 0,70 e 0,78, respectivamente ($P<0,0001$). A razão de triacilgliceróis e HDL-colesterol apresentou tendência de redução, sem diferenças estatística ao nível de $P>0,05$ entre os grupos C (com 2,79) e A10 (razão de 2,47). O índice aterogênico apresentou um decréscimo significativo que representou 53% para o grupo A10 (com valores de 0,28), se comparado ao grupo C (0,43) ($P<0,0001$).

FIGURA 35 - Concentrações plasmáticas de lipídeos totais, colesterol, triacilgliceróis, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, relação HDL-colesterol:colesterol total plasmático, razão triacilgliceróis:HDL-colesterol e índice aterogênico de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A10- ração com 2,9% de micélio, C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média ± EPM de 7 animais por grupo. ** $P < 0,001$ vs. C; *** $P < 0,0001$ vs. C

A presença do cogumelo a 2,9% na dieta não alterou a concentração de triglicerídeos e lipídeos totais no grupo A10, entretanto propiciou aumentos importantes no HDL-colesterol, resultando na redução no índice aterogênico e no risco de doenças cardiovasculares destes animais (LAW, WALD e THOMPSON, 1994).

Os parâmetros relacionados ao metabolismo lipídico, com as concentrações plasmáticas de lipídeos totais, colesterol total, triacilglicerol, HDL-colesterol e VLDL-colesterol, relação HDL:colesterol plasmático e índice aterogênico dos animais dos grupos C, CLip e A10Lip estão apresentados na Figura 36.

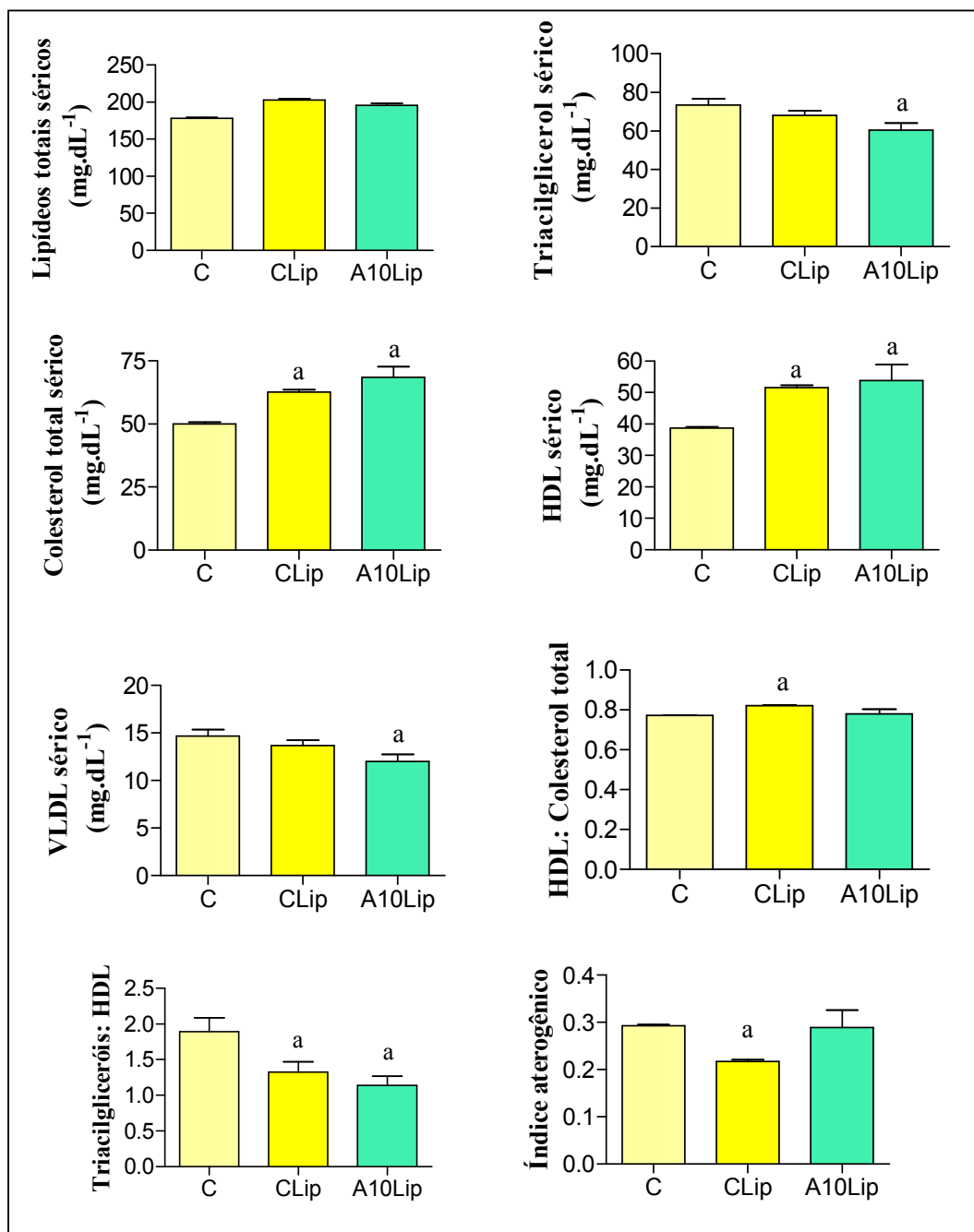
Os valores para lipídeos totais para os grupos C, CLip e A10Lip ($407,33 \text{ mg.dL}^{-1}$, $414,67 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $412,83 \text{ mg.dL}^{-1}$) não apresentaram alterações importantes. Os triacilgliceróis plasmáticos não apresentaram diferenças significativas entre o grupo o grupo C e CLip, com $73,33 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $68,00 \text{ mg.dL}^{-1}$, respectivamente. O grupo A10Lip apresentou um valor de $60,33 \text{ mg.dL}^{-1}$ para os triglicerídeos plasmáticos, o que significou uma redução significativa representada por 21%, se comparado ao grupo C ($P < 0,05$).

A presença de gordura saturada na dieta a 5% elevou a concentração do colesterol plasmático significativamente nos grupos CLip e A10Lip (com $62,7 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $68,5 \text{ mg.dL}^{-1}$, respectivamente), se comparado ao grupo C ($50,0 \text{ mg.dL}^{-1}$). Entretanto, este aumento pode ter sido influenciado pelo aumento significativo de 25% e 28% na concentração de HDL dos grupos CLip e A10Lip, com $51,5 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $53,83 \text{ mg.dL}^{-1}$, respectivamente, se comparados ao grupo C com $38,67 \text{ mg.dL}^{-1}$.

Os valores de VLDL-colesterol plasmáticos resultaram em decréscimos nos grupos CLip e A10Lip, com $13,67 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $12,00 \text{ mg.dL}^{-1}$, se comparados ao grupo C, com $14,67 \text{ mg.dL}^{-1}$. A redução foi significativa na comparação entre os grupos C e A10Lip ao nível de $P < 0,05$.

A razão HDL:colesterol plasmático apresentou aumento significativo entre os grupos C e CLip (0,77 e 0,82, respectivamente), sem diferenças na comparação destes grupos com o tratamento A10Lip, que apresentou uma razão de 0,78.

FIGURA 36 - Concentrações plasmáticas de lipídeos totais, colesterol, triacilgliceróis, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, razão HDL:colesterol plasmático, razão triacilgliceróis:HDL-colesterol e índice aterogênico de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo C - ração sem adição de cogumelo; CLip - ração com suplementação de 5% de lipídeos saturados, A10Lip- ração com 2,9% de micélio e 5% de lipídeos saturados.



NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 6 animais no grupo C, e de 7 para os grupos CLip e A10Lip.
^a $P < 0,05$ vs. C.

A razão de triacilgliceróis e HDL-colesterol resultou em diminuição significativa na comparação dos grupos CLip e A10Lip, com razão de 1,32 e 1,14, se comparados com o grupo C, com uma razão de 1,90 ($P > 0,001$), o que indica uma redução no risco de doenças cardiovasculares (DOBIASOVA; FROHLICH, 2001). O índice aterogênico apresentou um decréscimo significativo para o grupo CLip, com 0,21, se comparado ao grupo C, com 0,36. O grupo A10Lip, com 0,28 de índice aterogênico, não apresentou alterações importantes se comparados aos dois grupos.

No grupo A10Lip, suplementados com o cogumelo e com 5% de gordura saturada, quando comparado ao grupo CLip e ao grupo C, ocorreu aumento na concentração do colesterol total, com diminuição do VLDL e ainda aumento do índice aterogênico. Os aumentos nos valores de HDL e diminuição de triglicerídeos ocorreram no grupo A10Lip, e também para o grupo CLip. Estes resultados apresentaram-se inicialmente difíceis de entender e levaram a uma pesquisa aprofundada sobre o modelo animal ideal para estudos dos efeitos da dieta sobre o metabolismo lipoprotéico e do colesterol.

Atualmente, diversos modelos animais tem sido utilizados incluindo animais transgênicos ou camundongos “knock-out”. Entretanto, a maioria destes modelos difere do humano quanto a distribuição do colesterol plasmático e ao processamento das lipoproteínas nos compartimentos plasmáticos. Em porquinho da índia (“Guinea pigs”) a maior parte do colesterol é transformado em LDL, pela presença de proteína de transferência do éster colesterol e atividade de lipases lipoprotéicas o que resulta em um transporte reverso do colesterol e cascata de deslipidação semelhante ao que ocorre nos seres humanos (FERNANDEZ; VOLEK, 2006). Estes animais são omnívoros assim como os humanos, e seu metabolismo lipídico e de esteróis, e a fisiologia digestiva e cardiovascular é muito semelhante aos dos humanos. Já nos roedores, em contraste com os humanos, a maior parte do colesterol é transformada a frações de HDL, a não ser que recebam alimentação rica em gorduras saturadas e colesterol, o que ocasiona uma redução nos receptores do LDL-colesterol (REIN *et al.*, 2000). Assim, é possível entender porque ocorreu a redução nos níveis de LDL no grupo CLip e A10Lip, se comparados ao C. Desta forma, para obtenção de dados

conclusivos a respeito da atividade hipolipidêmica do cogumelo *A. brasiliensis* sugerimos a utilização de outros modelos animais em experimentos futuros, como porquinhos da índia ou “minipigs”. Os experimentos aqui apresentados foram executados com camundongos, pois os estudos imunológicos já estavam sendo realizados com estes animais, pela disponibilidade de uso destes animais e também baseado na literatura, onde diversos autores apresentavam suas pesquisas nesta área em camundongos e ratos. Apesar de ter sido constatado que aqui foi utilizado o melhor modelo animal, é possível verificar que a presença do cogumelo na dosagem de 2,9% na dieta, mesmo na presença de 5% de lipídeos saturados propiciou redução na concentração de triacilgliceróis, e de VLDL, o que diminuiu o risco de doenças cardiovasculares em 16% se comparada com a mesma dieta com lipídeos, do grupo CLip, através da razão triacilgliceróis:HDL- colesterol.

Permanecem em aberto os estudos de quais substâncias presentes no micélio do cogumelo *A. brasiliensis* atuam no metabolismo lipídico, assim como no seu modo de ação. Possivelmente, vários compostos bioativos presentes no cogumelo atuam de forma aditiva ou sinérgica, resultando no efeito modulador do metabolismo lipídico.

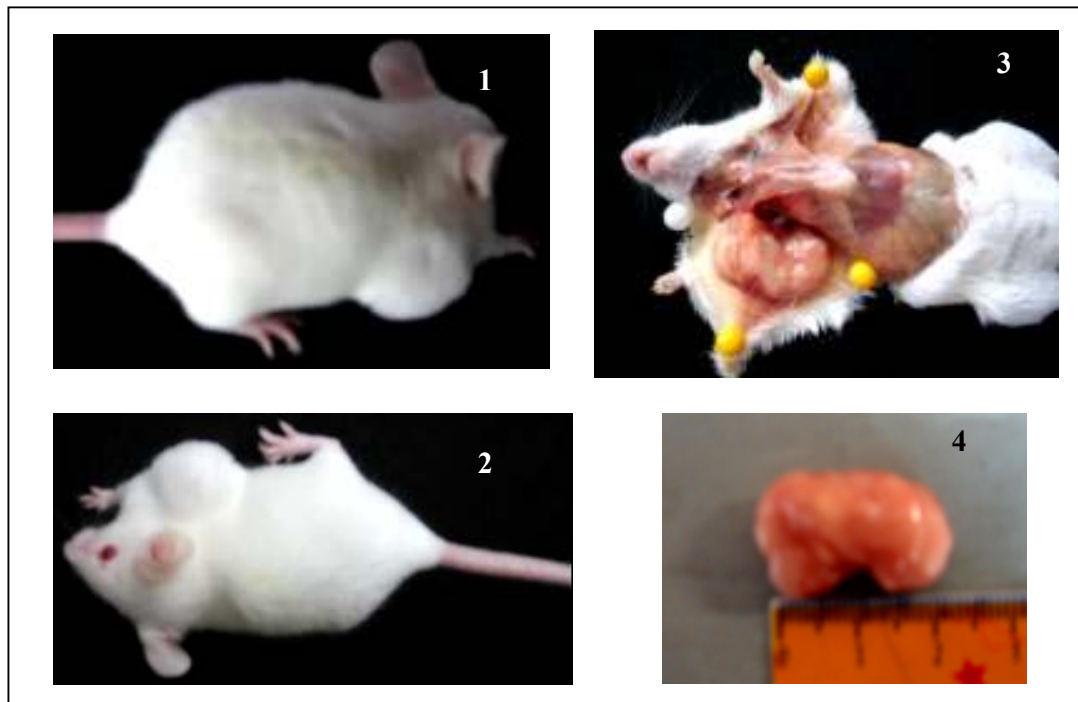
4.5 EFEITOS IMUNOMODULADORES NOS CAMUNDONGOS

4.5.1 Redução tumoral

A presença do tumor nos animais foi evidenciada externamente, conforme pode ser observado nas Fotos 1 e 2 da Figura 37, e internamente alojado do lado direito, com grandes proporções no grupo Controle, conforme pode ser visto nas Fotos 3 e 4 da Figura 37.

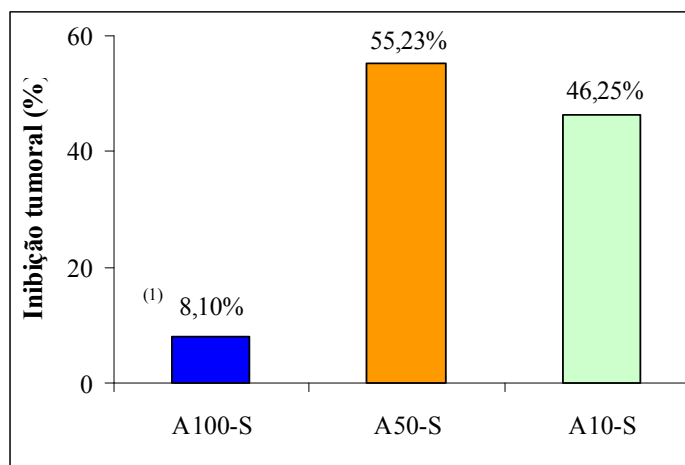
Nos grupos tratados cronicamente com o cogumelo, constatou-se uma redução tumoral de 8,1% no grupo A100, de 55,23% no grupo A50 e de 46,25% no grupo A10, quando comparado aos respectivos grupos Controle (Figura 38).

FIGURA 37 - Camundongos do grupo controle com tumor e tumor depois de extirpado.



NOTA: Fotos nº 1 e 2: camundongos com tumor; Foto nº 3: aspecto do tumor S-180 internamente e Foto nº 4: tamanho do tumor depois de retirado.

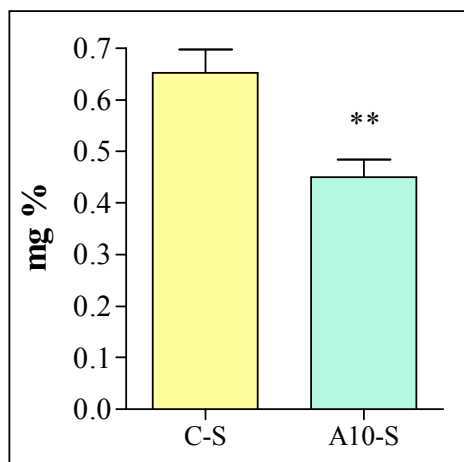
FIGURA 38 - Redução tumoral (%) de camundongos alimentados com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, inoculados com S-180: grupo A100, A50 e A10- ração com 29%, 14,5% e 2,9% de micélio, respectivamente.



NOTA: n= 10 animais para os grupos A100 e A50, e de 9 para o grupo A10. (1) % de redução comparados com o grupo Controle.

Os dados referentes ao peso de baço dos animais portadores de S-180 com e sem suplementação com o cogumelo *A. brasiliensis* estão apresentados na Figura 39. O peso médio dos baços dos animais do grupo A10-S e C-S apresentaram valores de 17,44 mg e 21,52 mg, respectivamente. A diminuição no tamanho dos baços do grupo A10-S representou 34,78%, comparado ao grupo C-S ($P < 0,01$). O tamanho do baço está relacionado com a função imunológica, e inicialmente esperava-se um aumento no volume deste órgão nos animais do grupo A10-S, pois este grupo apresentou redução tumoral de 46% se comparado com seu respectivo grupo C-S. Entretanto este fato não ocorreu, e possivelmente a atividade antitumoral nestes animais ocorreu com a participação de células esplênicas, mas a principal ação pode ter sido ocasionada pela participação de outras células do sistema imunológico.

FIGURA 39 - Peso do baço em mg per % de peso corpóreo dos de camundongos inoculados na décima semana com S-180 e alimentados durante 11 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A10-S - ração com 2,9% de micélio, C-S - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam média \pm EPM., $n=9$. ** $P < 0.01$ vs. C.

4.5.2 Células imunológicas

Os resultados obtidos da análise das células marcadas de baços dos camundongos dos grupos C, A100, A50, C-S, A100-S e A50-S estão apresentados na Figura 40 e foram calculados em porcentagens. Estes valores foram plotados nos gráficos e estão aqui apresentados entre parênteses, para tornar mais fácil o

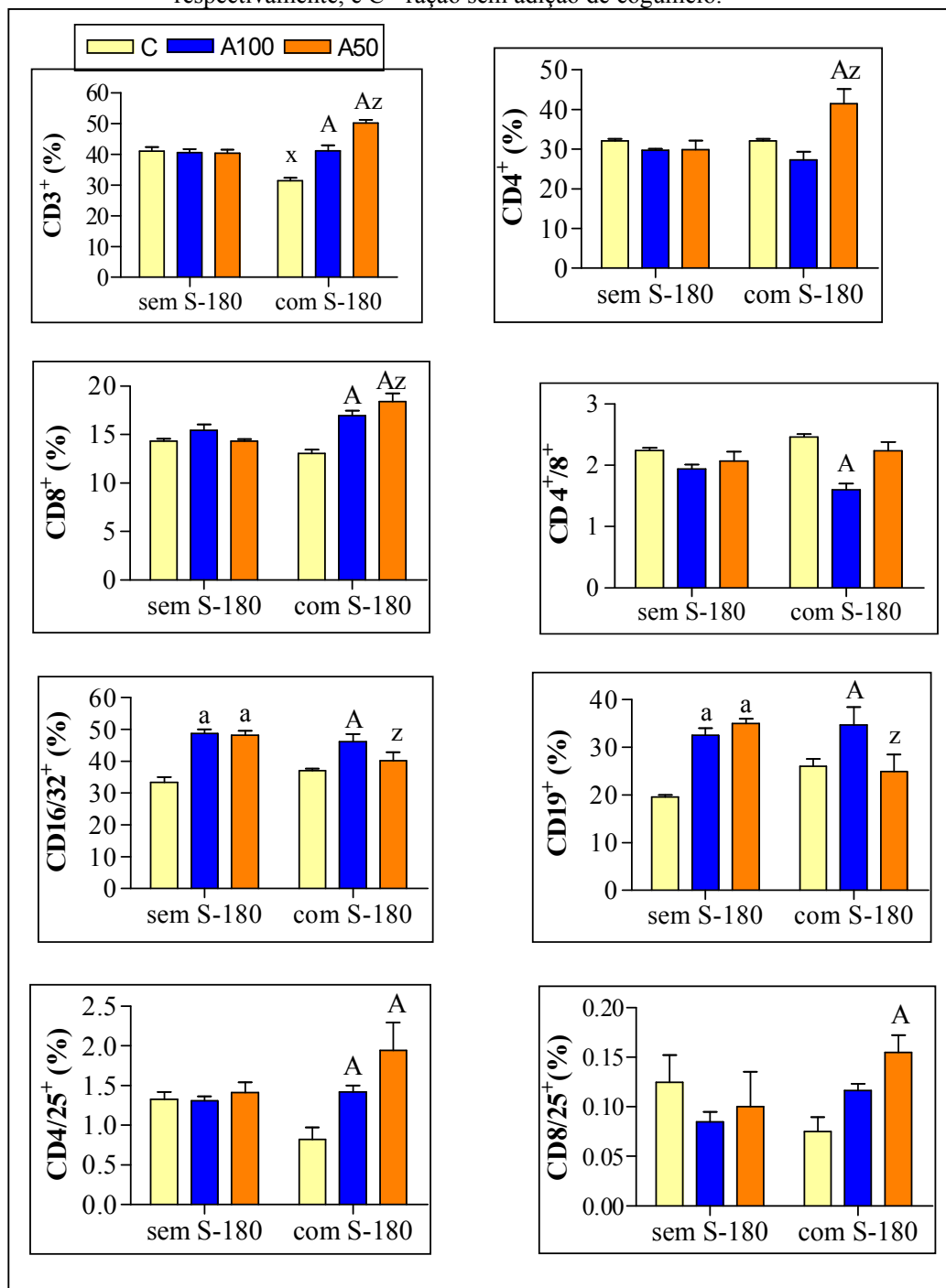
entendimento e diferenciação na comparação entre os grupos analisados, que representaram as porcentagens de alterações que ocorreram.

Os valores para as células esplênicas marcadas positivamente para $CD3^+$ não apresentaram alterações significativas entre os grupos C, A100 e A50 (com valores de 40,99%, 40,55% e 40,29%, respectivamente). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento significativo representado por 31% e 60% pelos grupos A100 e A50 (que apresentaram valores plotados no gráfico de 41,06 % e 50,14 %), em relação ao grupo C-S (31,36%). A presença do S-180 ocasionou um decréscimo das células $CD3^+$ no grupo C-S, e um aumento significativo no grupo A50, se comparados aos seus respectivos grupos sem s-180, grupos C e A50 (representados por x e z, respectivamente no gráfico).

Os valores para as células $CD4^+$ não apresentaram alterações significativas entre os grupos C, A100 e A50 (com valores de 32,05%, 29,68% e 29,80%, respectivamente). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento significativo representado por 29% no grupo A50 (que apresentou valor no gráfico de 41,43 %), em relação ao grupo C-S (32,07%), enquanto o grupo A100 (27,28%) não apresentou alterações, comparadas ao C. A presença do S-180 não ocasionou alterações na população de células $CD4^+$ na comparação dos grupos C e A100 com os grupos C-S e A100-S, respectivamente. O grupo A50-S apresentou aumento significativo para o grupo A50, se comparado ao grupo A50-S (representados por z gráfico).

Os valores para as células $CD8^+$ não apresentaram alterações significativas entre os grupos C, A100 e A50 (com 14,32%, 15,46% e 14,31%, respectivamente). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento significativo representado por 30% e 41% nos grupos A100-S e A50-S (com valores de 16,95% e 18,39%), em relação ao grupo C-S (13,07%). A presença do S-180 ocasionou um aumento das células $CD8^+$ significativo no grupo A50-S, se comparado ao grupo A50.

FIGURA 40 - Células esplênicas (%) de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média \pm erro padrão de 10 camundongos por grupo tratado. ^a $P < 0,05$ vs. C sem S-180; ^A $P < 0,05$ vs. C S-180; ^x $P < 0,05$ vs. C sem S-180; ^y $P < 0,05$ vs. A100 sem S-180; ^z $P < 0,05$ vs. A50 sem S-180.

A razão de células $CD4^+$: $CD8^+$ resultou em ausência de alterações significativas entre os grupos C, A100 e A50 (com 2,24, 1,94 e 2,07, respectivamente). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um decréscimo significativo representado por 35% no grupo A100 (1,60), em relação ao grupo C-S (2,46), enquanto o grupo A50-S não apresentou alterações importantes se comparados com os outros grupos (2,24).

As quantidades de células $CD16/32^+$ apresentaram aumentos significativos representados e que representaram 46% e 44% para os grupos A100 e A50 (com 48,68% e 48,26%, respectivamente), se comparados ao grupo C (33,46%). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento significativo representado por 25% no grupo A100-S (46,33%) em relação ao grupo C-S (37,04%), enquanto o grupo A50-S (40,24%) apresentou apenas diferença significativa se comparado com seu respectivo grupo sem S-180, o grupo A50-S (representado pela letra z no gráfico).

Os valores para as células $CD19^+$ apresentaram aumentos significativos representados por de 66% e 79% para os grupos A100 e A50 (com 32,58% e 35,06%, respectivamente), se comparados ao grupo C (19,59%). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento significativo representado por 33% no grupo A100-S (34,63%) em relação ao grupo C-S (26,05%), enquanto o grupo A50-S não apresentou alterações importantes (24,90%). Na comparação dos grupos com e sem a presença do S-180, observou-se uma diferença significativa entre os grupos C-S e C.

Os dados apresentados para os valores de células valores $CD4/25^+$ e $CD8/25^+$ estão apresentados e foram analisados estatisticamente sem prévio tratamento dos dados, apesar de serem valores baixos.

Os valores para as células $CD4/25^+$ não apresentaram alterações significativas entre os grupos C, A100 e A50 (com 1,33%, 1,31% e 1,41%, respectivamente). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento significativo representado por 72% e 136% nos grupos A100-S e A50-S (1,42% e 1,95%), em relação ao grupo C-S (0,83%).

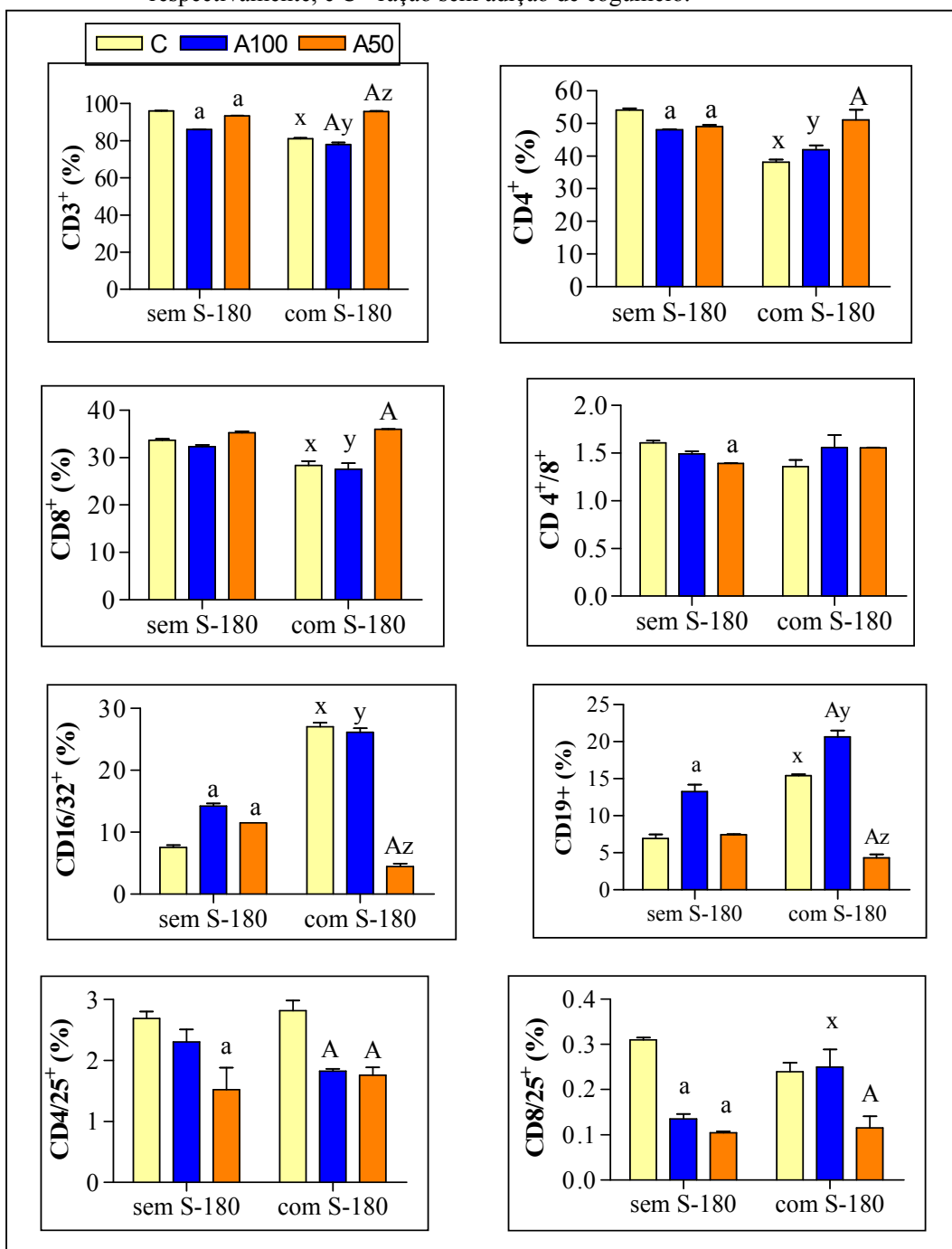
A população de células $CD8/25^+$ não apresentou diferenças significativas entre os grupos C, A100 e A50 (com 0,13%, 0,09% e 0,10%, respectivamente). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento significativo representado por 107% no grupo A50-S (0,16%) em relação ao grupo C-S (0,08%), enquanto o grupo A100-S (0,12%) não apresentou diferença significativa se comparado com os outros grupos.

Os resultados obtidos da análise das células marcadas dos linfonodos axilares dos camundongos dos grupos C, A100, A50, C-S, A100-S e A50-S estão apresentados na Figura 41 e são apresentados da mesma maneira que os dados das células esplênicas da Figura 40 foram calculados em porcentagens.

Os valores para as células de linfonodos axilares marcadas positivamente para $CD3^+$, apresentaram decréscimos significativos representados por 11% e 3% para os grupos A100 e A50 (com valores de 85,97% e 93,39%, respectivamente) se comparados com o grupo C (96,19%). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se uma diminuição significativa representada por 4% para o grupo A100-S (77,96%) e um aumento significativo de 18% no A50-S (95,71 %), em relação ao grupo C-S (81,07%). A presença do S-180 ocasionou um decréscimo significativo das células $CD3^+$ no grupo C-S e A100-S, e um aumento significativo no grupo A50-S, se comparados aos seus respectivos grupos sem S-180, grupos C, A100 e A50.

Os valores para as células $CD4^+$ apresentaram decréscimos significativos representados por 11% e 10% para os grupos A100 e A50 (com valores de 48,05% e 49,00%, respectivamente) se comparados com o grupo C (54,16%). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento significativo representado por 34% para o grupo A50-S (51,15%) em relação ao grupo C-S (31,16%), enquanto o grupo A100-S (41,94%) não apresentou diferenças se comparado com o C-S. A presença do S-180 ocasionou um decréscimo significativo no grupo C-S e A100-S, se comparados aos seus respectivos grupos sem S-180, grupos C e A100.

FIGURA 41 - Células de linfonodos (%) de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média ± erro padrão de 10 camundongos por grupo tratado. ^a $P < 0,05$ vs. C sem S-180; ^A $P < 0,05$ vs. C S-180; ^x $P < 0,05$ vs. C sem S-180; ^y $P < 0,05$ vs. A100 sem S-180; ^z $P < 0,05$ vs. A50 sem S-180.

Os valores para as células $CD8^+$ não apresentaram alterações significativas entre os grupos C, A100 e A50 (com 33,72%, 32,30% e 35,24%, respectivamente). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento significativo representado por 27% para o grupo A50-S (35,97%) em relação ao grupo C-S (28,36%), enquanto o grupo A100-S (27,58%) não apresentou diferenças se comparado com o C-S. A presença do S-180 ocasionou um decréscimo significativo nos grupo C-S e A100-S, se comparados aos seus respectivos grupos sem S-180, C e A100.

A razão de células $CD4^+ : CD8^+$ resultou em decréscimo significativo representado por 14% entre os grupos A50 (com 2,24) e C (1,61). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento no grupo A100-S (1,60) e grupo A50-S (1,55) se comparado ao grupo C-S (1,36), entretanto sem diferença estatística ($P > 0,05$).

As contagens de células $CD16^+ / 32^+$ apresentaram aumentos significativos representados por 90% e 53% para os grupos A100 e A50 (com 14,23% e 11,52%, respectivamente), se comparados ao grupo C (7,51%). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um decréscimo significativo representado por 84% no grupo A50-S (4,43%) em relação ao grupo C-S (27,08%), enquanto o grupo A100-S (26,13%) não apresentou diferença significativa vs. C-S. A presença do S-180 ocasionou aumentos significativos nos grupos A100-S e C-S, e diminuição significativa no grupo A50-S, se comparados com seus respectivos grupos sem S-180.

Os valores para as células $CD19^+$ apresentaram aumentos significativos representado por 91% para o grupo A100 e A50 (com 13,30%), se comparados ao grupo C (6,94%), e o grupo A50 (7,46%). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se um aumento significativo representado por 34% no grupo A100-S (20,64%) e um decréscimo significativo de 72% do grupo A50-S (4,32%) em relação ao grupo C-S (15,43%). Na comparação dos grupos com e sem a presença do S-180 observou-se um aumento significativo para os grupos C-S e A100-S, e diminuição significativa para o grupo A50-S, se comparados aos seus respectivos grupos sem S-180.

Os valores para as células $CD4^+/25^+$ apresentaram decréscimo significativo representado por 43% para o grupo A50 (1,53%) comparado com o grupo C (2,69%), enquanto o grupo A100 (2,31%) não apresentou alterações importantes. Os grupos A100-S e A50-S (com valores de 1,83% e 1,76%) apresentaram decréscimo significativo representado por 35% e 38%, respectivamente, se comparados ao grupo C-S (2,82%). Na comparação dos grupos inoculados sem e com S-180, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados.

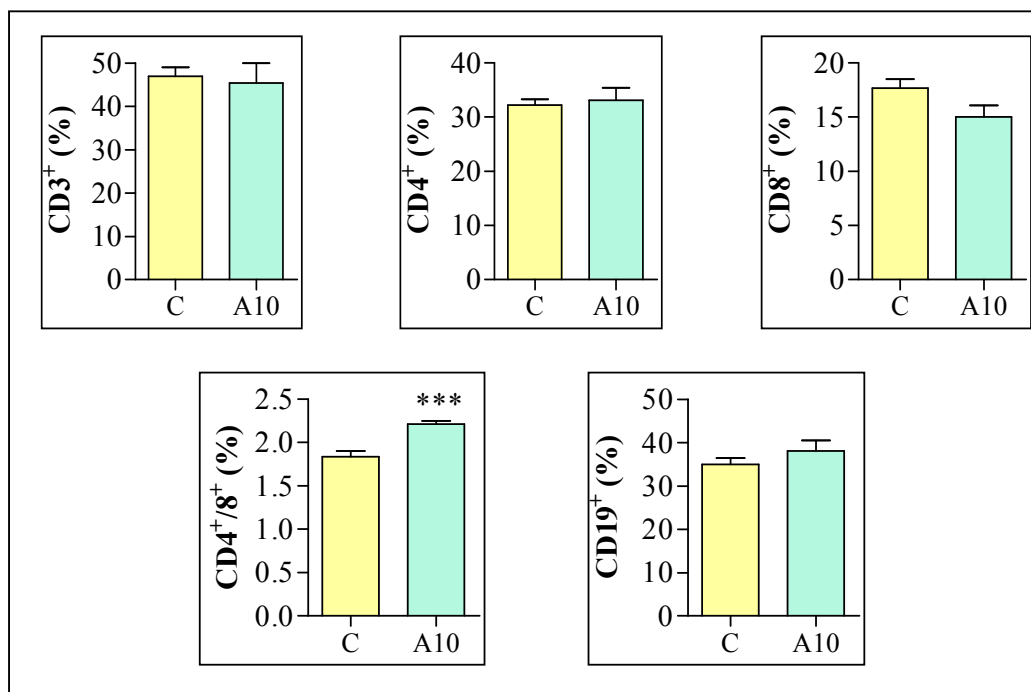
A população de células $CD8^+/25^+$ apresentou decréscimos significativos, que representaram 56% e 66% dos grupos A100 e A50 (com valores de 0,14% e 0,115, respectivamente) se comparados ao grupo C (0,31). O grupo A50-S (0,12%) apresentou também um decréscimo significativo se comparado ao grupo C-S (0,24), enquanto o grupo A100-S (0,25%) apresentou diminuição significativa se comparado com seu respectivo grupo A100, sem a presença do S-180.

Os resultados obtidos da análise das células de baço dos camundongos dos grupos C e A10 estão apresentados na Figura 42 e são apresentados da mesma maneira que os dados das células esplênicas da Figura 40.

Os valores para as células esplênicas marcadas positivamente para $CD3^+$ não apresentaram alterações significativas entre os grupos C e A10 (com valores de 46,91% e 45,41%, respectivamente). Os valores para as células esplênicas marcadas positivamente para $CD4^+$ não apresentaram alterações significativas entre os grupos C e A10 (com valores de 32,24% e 33,15%, respectivamente), assim como para as células $CD8^+$ (com valores de 17,69% e 15,01%, respectivamente). Entretanto, a razão de células $CD4^+:CD8^+$ resultou em aumento significativo representado por 20% ($P<0.001$) para o grupo A10 (com 1,84), se comparado ao grupo C (2,21).

Os valores para as células esplênicas marcadas positivamente para $CD19^+$ não apresentaram alterações significativas entre os grupos C e A10 (com valores de 34,93% e 38,06%, respectivamente).

FIGURA 42 - Células esplênicas (%) de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: A10 - ração com 2,9%, e C - ração sem adição de cogumelo.



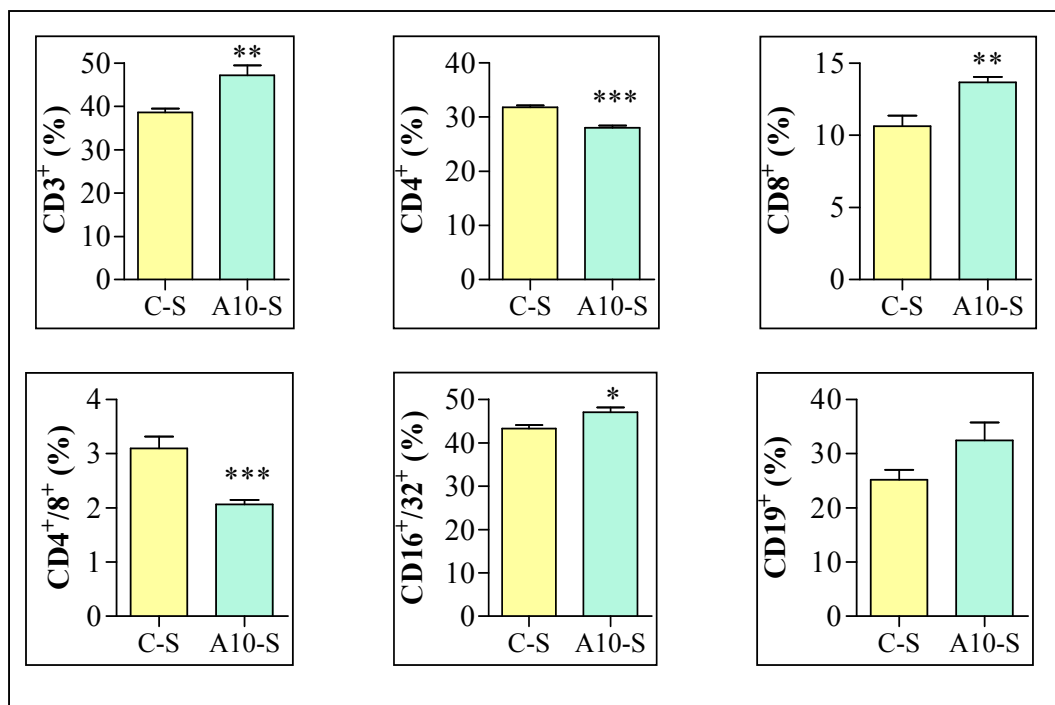
NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 7 camundongos por grupo tratado. *** $P < 0,001$ vs. C.

Os resultados obtidos da análise das células marcadas dos baços dos camundongos dos grupos C-S e A10-S estão apresentados na Figura 43.

Os valores para as células marcadas positivamente para CD3⁺, apresentaram aumento significativo ($P < 0.01$), representado por 22% do grupo A10-S (com valores de 47,19%), se comparado ao grupo C-S (com valores plotados no gráfico de 38,55%).

Os valores para as células marcadas positivamente para CD4⁺, apresentaram redução significativa ($P < 0.001$), representada por 12% para o grupo A10-S (com valores plotados no gráfico de 28,02%), se comparado ao grupo C-S (com valores de 31,82%). Os valores para as células marcadas positivamente para CD8⁺, apresentaram aumento significativo ($P < 0.01$), representado por 29% do grupo A10-S (com valores de 13,68%), se comparado ao grupo C-S (com valores de 10,63%). A razão de células CD4⁺:CD8⁺ resultou em redução significativa representada por 33% ($P < 0.001$) para o grupo A10 (com 2,06), se comparado ao grupo C (3,10).

FIGURA 43 - Células esplênicas (%) de camundongos alimentados durante 11 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis* com inoculação de S-180 na sétima semana: grupo A10-S - ração com 2,9% e C-S - ração sem adição de cogumelo.



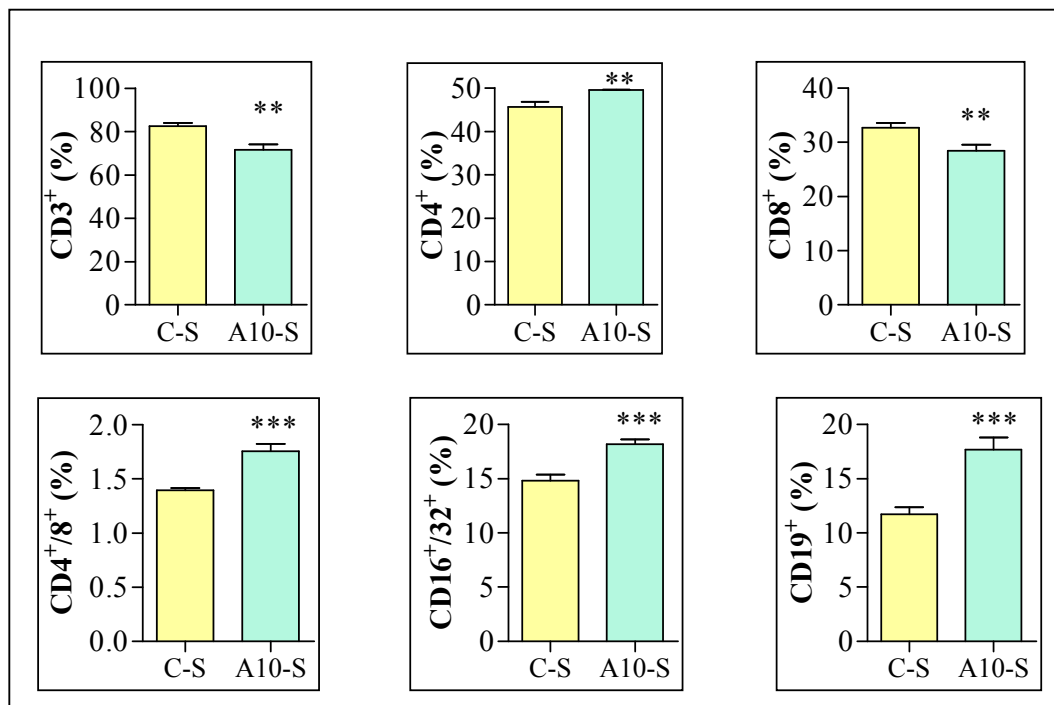
NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 9 camundongos por grupo tratado. * $P < 0,05$ vs. C-S; ** $P < 0,01$ vs. C-S; *** $P < 0,001$ vs. C-S.

Os valores para as células marcadas positivamente para CD16⁺/32⁺ apresentaram aumento significativo ($P < 0.05$), representado por 9% do grupo A10-S (com valores de 17,08%), se comparado ao grupo C-S (com valores de 43,27%). Os valores para as células marcadas positivamente para CD19⁺ não apresentaram alterações significativas entre os grupos C-S e A10-S ($P > 0.05$), (com valores de 33,46% e 25,18%, respectivamente), em função da grande variância apresentada entre os dados do grupo A10-S, entretanto a diferença numérica e representada por 29% indica uma tendência de aumento destas células.

Os resultados obtidos da análise das células marcadas dos linfonodos axilares dos camundongos dos grupos C-S e A10-S estão apresentados na Figura 44.

Os valores para as células marcadas positivamente para CD3⁺ apresentaram redução significativa ($P < 0.01$), representado por 13% na comparação entre os grupos C-S e A10-S (com valores de 82,59% e de 71,58%, respectivamente).

FIGURA 44 - Células de linfonodos axilares (%) de camundongos alimentados durante 11 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis* com inoculação de S-180 na sétima semana: grupo A10-S - ração com 2,9% e C-S - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 9 camundongos por grupo tratado. ** $P < 0,01$ vs. C-S; *** $P < 0,001$ vs. C-S.

Os valores para as células marcadas positivamente para CD4⁺, apresentaram aumento significativo ($P < 0.001$), representada por 9% para o grupo A10-S (com valores plotados no gráfico de 49,52%), se comparado ao grupo C-S (com valores de 45,60%). Os valores para as células marcadas positivamente para CD8⁺, apresentaram redução significativa ($P < 0.01$), representado por 12% do grupo A10-S (com valores de 28,48%), se comparado ao grupo C-S (com valores de 32,71%). A razão de células CD4⁺:CD8⁺ resultou em aumento significativo representado por 26% ($P < 0.001$) para o grupo A10 (com 1,76), se comparado ao grupo C (1,40).

Os valores para as células marcadas positivamente para CD16⁺/32⁺ apresentaram aumento significativo ($P < 0.001$), representado por 23% do grupo A10-S (com valores de 18,18%), se comparado ao grupo C-S (com valores de 14,82%). Os valores para as células marcadas positivamente para CD19⁺ também apresentaram

aumento significativo ($P < 0.001$), representado por 51% do grupo A10-S (com valores de 11,69%), se comparado ao grupo C-S (com valores de 11,74%).

4.5.3 Citocinas

Os resultados obtidos da análise das citocinas plasmáticas dos camundongos dos grupos C, A100, A50, C-S, A100-S e A50-S estão apresentados na Tabela 16. As citocinas IL 12p70, MCP-1 e IL-10 não foram detectadas na análise.

TABELA 16 - Concentração de citocinas de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 2,9% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.

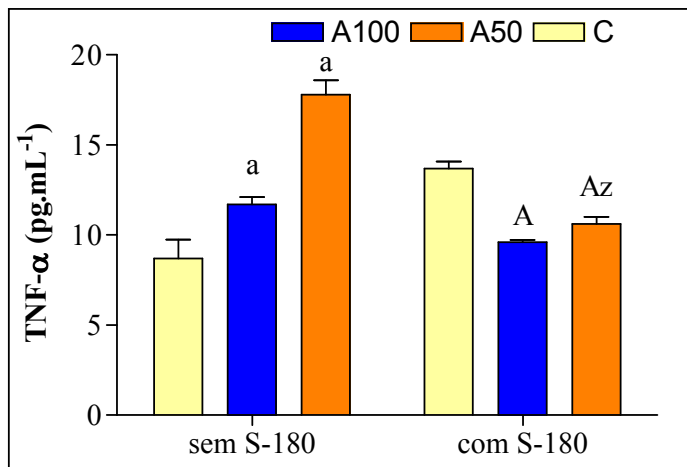
Citocinas (pg.ml ⁻¹)	C	C-S	A100	A100-S	A50	A50-S
TNF- α	8,7 (± 1.03)	13,7 (± 0.37)	11,7 (± 0.43)	9,6 (± 0.11)	17,8 (± 0.79)	10,6 (± 0.41)
IFN- γ	...	1,9 (± 0.11)	4,3 (± 0.09)	...
IL-6	3,3 (± 0.00)

NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 10 camundongos por grupo tratado. ...- não detectado.

A IL-6 foi detectada no grupo A100-S, com valor de 3,3 pg.ml⁻¹. O IFN- γ foi detectado nos grupos C-S e A50, com valores de 1,9 pg.ml⁻¹ e 4,3 pg.ml⁻¹, respectivamente. Os resultados da análise de TNF- α estão apresentados na Figura 45.

Os valores de TNF- α apresentaram aumentos significativos representados por 35% e 105% para os grupos A100 e A50 (com valores de 11,70 pg.ml⁻¹ e 17,80 pg.ml⁻¹, respectivamente) se comparados com o grupo C (8,70 pg.ml⁻¹). Na comparação dos grupos inoculados com S-180, verificou-se uma redução significativa representada por 30% para o grupo A100-S (9,60 pg.ml⁻¹) e de 23% no A50-S (10,60 pg.ml⁻¹), em relação ao grupo C-S (13,70 pg.ml⁻¹). A presença do S-180 ocasionou um decréscimo significativo nos níveis de TNF- α no grupo A50-S, se comparado ao seu respectivo grupo sem S-180, grupo A50.

FIGURA 45 - Concentração de citocina plasmática TNF- α de camundongos alimentados durante 14 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, com e sem inoculação de S-180 na décima semana: grupo A100 e A50 - ração com 29% e 14,5% de micélio, respectivamente, e C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média \pm erro padrão de 10 camundongos por grupo tratado. ^a $P < 0,05$ vs. C sem S-180; ^A $P < 0,05$ vs. C S-180; ^{Az} $P < 0,05$ vs. C sem S-180.

Os resultados obtidos da análise das citocinas plasmáticas dos camundongos dos grupos C e A10 sem sarcoma estão apresentados na Tabela 17. As análises da IL 12p70 não apresentaram diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre os grupos C e A10, em função da grande variância ocorrida no grupo A10, entretanto os valores numéricos representaram um aumento de 33%, o que indica uma tendência de aumento na concentração desta interleucina no grupo A10. A IL-10 não apresentou diferenças estatísticas ($P > 0,05$), mas a redução de 19% indica uma tendência de diminuição na concentração desta IL na presença do cogumelo *A. brasiliensis* na dieta dos camundongos.

Os valores encontrados para TNF- α e MCP-1 foram semelhantes aos do grupo C, e não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$).

As análises de IFN- γ resultaram em aumento significativo ($P < 0,01$) entre os grupos C e A10, representado por 49%. A concentração da IL-6 resultou em aumento significativo ($P < 0,01$) entre os grupos C e A10, representado por 165%.

TABELA 17 - Concentração de citocinas plasmáticas de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, grupo A10 - ração com 2,9% e de micélio e C - ração sem adição de cogumelo.

Citocinas(pg.ml ⁻¹)	C	A10
IL 12p70	35.88 (±1.99)	47.50 (±6.53)
TNF- α	25.40 (±0.71)	24.98 (±1.21)
IFN- γ	7.00 (±0.52)	10.43 (±0.76)**
MCP-1	54.63 (±4.15)	54.70 (±0.51)
IL-10	35.33 (±4.84)	28.63 (±2,15)
IL-6	10.00 (±0.60)	26.48 (±3.91)**

NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 7 camundongos por grupo tratado.

Os resultados obtidos da análise das citocinas no sobrenadante de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos dos grupos C e A10 sem sarcoma e cultivados *in vitro* estão apresentados na Tabela 18.

Os valores encontrados para IFN- γ foram semelhantes aos do grupo C, e não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$). Apesar de não ter havido diferença estatística para a IL-10 ($P>0,05$), os valores do grupo A10 representaram um aumento de 17%, se comparado ao grupo C. A IL-6 também não apresentou diferenças significativas ($P>0,05$), em função da grande variância encontrada nos grupos C e A10, entretanto observou-se uma redução de 40% na concentração desta IL no sobrenadante de macrófagos peritoneais do grupo A10 se comprado ao C.

TABELA 18 - Concentração de citocinas no sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*, grupo A10 - ração com 2,9% e de micélio e C - ração sem adição de cogumelo.

Citocinas (pg.mL ⁻¹)	C	A10
IL 12p70	34.98 (±1.65)	43.78 (±3.64)*
TNF- α	354.33 (±28.08)	202.18 (±24.78)**
IFN- γ	9.75 (±0.58)	10.85 (±0.25)
MCP-1	2148.08 (±72.68)	920.50 (±63.88)***
IL-10	76.33 (±14.51)	89.10 (±16,23)
IL-6	7759.29 (±1161.55)	4622.78 (±1234.49)

NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 7 camundongos por grupo tratado.

As análises da IL 12p70 resultaram em aumento significativo ($P<0,05$), o que representou 25% de aumento na concentração de interleucina.

Os valores encontrados para TNF- α e MCP-1 tiveram uma redução de significativa representada por 43% ($P<0,01$) e de 57% ($P<0,001$), respectivamente, para o grupo A10, se comparado ao C.

4.5.4 Atividade de macrófagos e parâmetros oxidativos

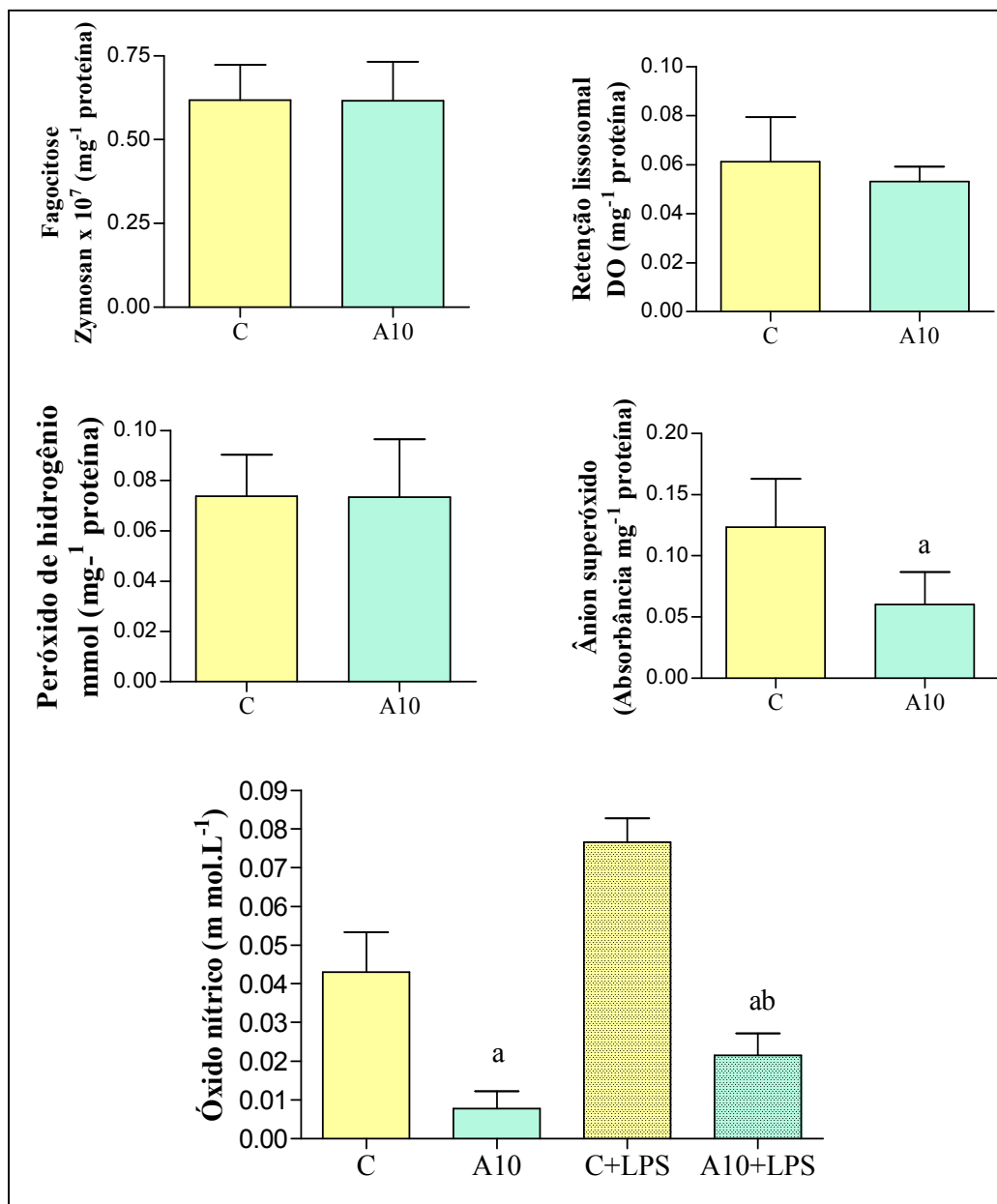
A atividade dos macrófagos e alguns parâmetros oxidativos no sobrenadante de macrófagos peritoneais cultivados *in vitro* de fagocitose, volume lisossomal, peróxido de H, ânion superóxido e óxido nítrico, na presença e ausência de LPS dos animais dos grupos C e A10 estão apresentados na Figura 46.

Os resultados de fagocitose não apresentaram diferenças entre os grupos A10 e C, que tiveram valores de 0,618 zymosan. 10^7 mg⁻¹ proteína e 0,616 zymosan. 10^7 mg⁻¹ proteína. O volume lisossomal apresentou redução para o grupo A10, com 0,0532 DO mg⁻¹ proteína, se comparado ao grupo C, com 0,0612 DO mg⁻¹ proteína, entretanto sem significância estatística ($P>0,05$).

Os resultados de peróxido de hidrogênio também não apresentaram diferenças entre os grupos C e A10, com valores de 0,0738 μ mol mg⁻¹ proteína e 0,0734 μ mol mg⁻¹ proteína., respectivamente. Para o ânion superóxido foi observada uma redução significativa ($P<0,001$) no grupo A10, com 0,0602 absorbância mg⁻¹ proteína, se comparado ao grupo C, com 0,1236 absorbância mg⁻¹ proteína.

O óxido nítrico apresentou decréscimos significativos ($P<0,0001$) tanto na ausência como na presença de LPS; o grupo A10 apresentou valores de 0,0078 e o grupo C 0,043, já o grupo A10LPS teve resultados de 0,0215 μ mol.L⁻¹, enquanto o grupo CLPS apresentou valores de 0,0765 μ mol.L⁻¹. O grupo A10 quando estimulado na presença do LPS, grupo A10LPS, apresentou redução significativa mesmo comparada ao grupo C sem LPS ($P<0,0001$).

FIGURA 46 - Concentrações de parâmetros oxidativos de macrófagos peritoneais: fagocitose, volume lisossomal, peróxido de H, ânion superóxido e óxido nítrico sem LPS e com LPS de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo A10- ração com 2,9% de micélio, C - ração sem adição de cogumelo.



NOTA: Dados representam a média \pm EPM de 7 camundongos por grupo tratado. ^a $P < 0,05$ vs. C; ^b $P < 0,05$ vs. C+LPS.

Os parâmetros oxidativos no sobrenadante de macrófagos peritoneais cultivados *in vitro* de fagocitose, volume lisossomal, peróxido de H, ânion superóxido e óxido

nítrico, na presença e ausência de LPS dos animais dos grupos C, CLip e A10Lip estão apresentados na Figura 47.

Os resultados de fagocitose apresentaram aumentos na presença de lipídeos, sem significância estatística ($P>0,05$) na comparação do grupo CLip (0,903 zymosan. 10^7 mg⁻¹ proteína) com o grupo C (0,082 zymosan. 10^7 mg⁻¹ proteína), e com diferença ao nível de $P<0,05$ entre os grupos A10Lip (1,088 zymosan. 10^7 mg⁻¹ proteína) e C.

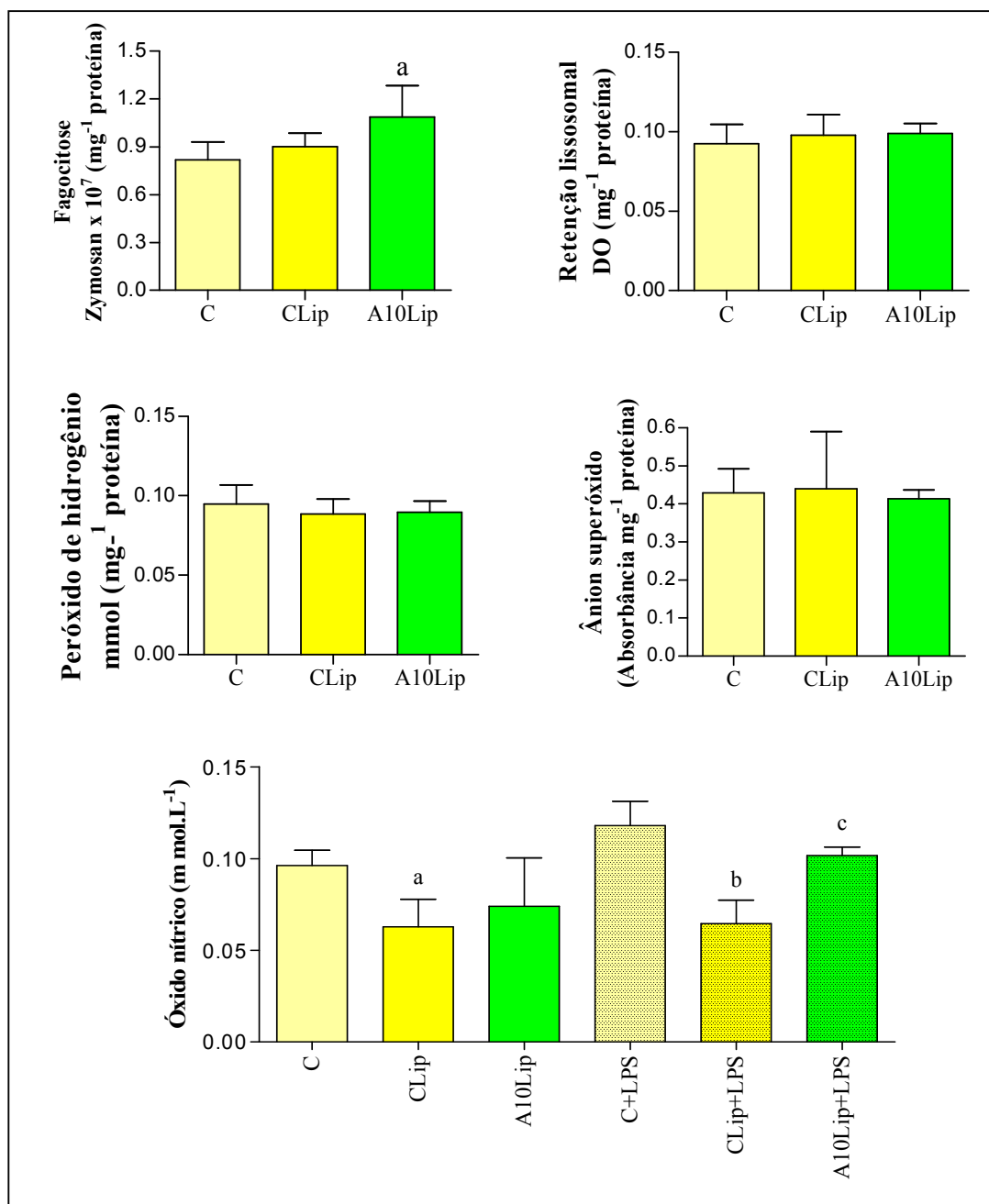
O volume lisossomal não apresentou diferenças significantes entre os grupos C, CLip e A10Lip, com valores de 0,0925 DO mg⁻¹ proteína, 0,0976 DO mg⁻¹ proteína e 0,099 DO mg⁻¹ proteína, respectivamente ($P>0,05$).

O peróxido de hidrogênio apresentou redução sem diferença significativa entre os grupos C, CLip e A10Lip, com valores de 0,0949 μ mol mg⁻¹ proteína, 0,0885 μ mol mg⁻¹ proteína e 0,0899 μ mol mg⁻¹ proteína, respectivamente ($P>0,05$).

Para o ânion superóxido não foram observadas diferenças entre os grupos os grupos C, CLip e A10Lip, com valores de 0,429 absorbância mg⁻¹ proteína, 0,0440 absorbância mg⁻¹ proteína e de 0,0237 absorbância mg⁻¹ proteína, respectivamente ($P>0,05$).

O óxido nítrico apresentou decréscimos na presença de lipídeos, tanto na ausência como na presença de LPS. O grupo A10Lip apresentou valores de 0,074 μ mol.L⁻¹ e o grupo C 0,0628 μ mol.L⁻¹; a redução foi significativa apenas na comparação do grupo C com o grupo CLip, que apresentou valores de 0,0963 μ mol.L⁻¹ ($P<0,05$). Na presença do LPS, ocorreu a mesma redução sem diferença estatística na comparação do grupo A10Lip+LPS, com 0,1018 μ mol.L⁻¹, ao grupo C+LPS, com 0,118 μ mol.L⁻¹; a redução foi significativa apenas na comparação do grupo C+LPS com o grupo CLip+LPS, que apresentou valores de 0,0645 μ mol.L⁻¹ ($P<0,05$).

FIGURA 47 - Concentrações de parâmetros oxidativos de macrófagos peritoneais: fagocitose, volume lisossomal, peróxido de H, ânion superóxido e óxido nítrico sem LPS e com LPS de camundongos alimentados durante 12 semanas com ração suplementada com micélio de *A. brasiliensis*: grupo C - ração sem adição de cogumelo; CLip - ração com suplementação de 5% de lipídeos saturados, A10Lip- ração com 2,9% de micélio e 5% de lipídeos saturados.



NOTA: Dados representam a média ± EPM de 6 animais no grupo C, e de 7 para os grupos CLip e A10Lip. aP<0,05 vs. C; bP<0,05 vs. C+LPS; cP<0,05 vs. CLip+LPS.

Os extratos de cogumelos têm sido proclamados como promotores da saúde e estimulantes do sistema imune (KIDD, 2003). Usualmente a maior parte das pesquisas tem utilizado frações ou o corpo de frutificação dos cogumelos. Neste trabalho escolheu-se usar o micélio produzido por cultivo sólido por maior rapidez e controle de produção e ter presente em sua composição os princípios ativos como polissacarídeos, lectinas, ergosterol, e outros.

Inicialmente, pensou-se que a presença do S-180 nos camundongos do grupo C-S ocasionaria caquexia, pois o efeito letal de tumores malignos normalmente resulta nesta síndrome (TISDALE, 1999). Entretanto, este fato não ocorreu, pois os animais do grupo C-S (grupo CS do Experimento I, referentes aos grupos A100 e A50) continuaram a ganhar peso após o implante do tumor, e observando-se os dados de peso da carcaça na Tabela 14, verificou-se que o ganho de peso não foi resultante de massa tumoral. É possível que o S-180 não tenha causado caquexia até o momento de sacrifício dos animais, apesar do volume tumoral ser grande em alguns animais.

A presença do cogumelo *A. brasiliensis* na dieta, na dosagem de 29%, resultou em atividade estimulante sobre o sistema imune, com participação da via 2, pela ativação da resposta humoral, detectado pelo aumento das células B CD19⁺ e com participação da resposta imune inespecífica, com aumento nas células CD16⁺:32⁺, entre as quais estão as células NK. Neste grupo de animais a via 1 foi levemente inibida a nível local de linfonodos da região axilar, com diminuição das células Th (CD4⁺) e linfócitos T citotóxicos ativados (CD8⁺:25⁺), entretanto sem apresentar este efeito inibidor a nível sistêmico, demonstrado pela ausência de alterações nas células Th e T citotóxicas no baço. O cogumelo também não propiciou efeitos antiinflamatórios.

A dosagem de 14,5% na dieta dos animais do grupo A50 ocasionou um efeito estimulante sobre o sistema imune, com a participação da via 2 e ativação da resposta humoral, representada pelo aumento de células B CD19⁺ ao nível de baço, e ainda células CD16⁺:32⁺ em todo organismo. A resposta celular revelou ter sofrido um leve efeito inibidor, com diminuição das células Th CD4⁺, e também das células ativadas Th e T citotóxicas, representadas pelas células CD4⁺:25⁺ e CD8⁺:25⁺.

Na presença do S-180, o cogumelo na dosagem de 29%, no grupo A100S propiciou diminuição nos níveis de TNF- α , e sem outras alterações nos parâmetros da via 1. Já a via 2 foi estimulada, pela ativação da resposta humoral, com aumento nas células B. Ocorreu um efeito modulador na resposta celular com aumento de células T citotóxicas, e de células *Th* ativadas a nível sistêmico, inclusive com participação da imunidade inespecífica, observado pelo aumento de células NK CD16⁺:32⁺. Este efeito do cogumelo sobre o sistema imune resultou em uma redução tumoral de 8,1%.

O cogumelo propiciou resultados bem mais expressivos na dosagem de 14,5% do grupo A50S com atividade antitumoral de 53,23%. Nestes animais ocorreu ativação da resposta celular, com aumentos nas células *Th* e T citotóxicas, sem, entretanto haver participação das células NK. A resposta humoral também não foi estimulada ao nível sistêmico, representado pelas células B do baço, e a nível local, próximo do S-180, ocorreu uma diminuição destas células.

O aumento de células citotóxicas CD8⁺ verificado no grupo A50S também foi observado por LEE et al (2003), quando usaram o cogumelo *A. brasiliensis*. A presença de TNF- α nos grupos A100 e A50 pode ter sido por ação de macrófagos ativados, pois estas células são as principais produtoras desta citocina, porém esta molécula também é produzida em menores quantidades por células T, B, NK, LAK. A produção em baixas concentrações de TNF- α promove a expressão de receptores de superfície pelas células endoteliais, favorecendo a aderência de leucócito que migram para os sítios de inflamação; ativa os macrófagos para produção de IL-1, IL-6 e TNF, e aumenta a expressão de moléculas MHC-I. Tanto o extrato aquoso do micélio de *A. brasiliensis* como os polissacarídeos produzidos por cultivo submerso induziram macrófagos a produzirem TNF- α , em experimentos conduzidos *in vitro* (SORIMACHI et al., 2001a; SHU; WEN, LIN, 2003).

Aumentos nos níveis de células NK, detectado pelas células CD16⁺:32⁺ foram verificados nos grupos A100 e A50, tanto ao nível de baço como de linfonodos; entretanto na presença do S-180 os resultados não foram tão expressivos, pois então estas células apresentaram apenas aumentos no grupo A100 ao nível de baço. Outros pesquisadores também detectaram aumentos de células NK após a administração oral

do extrato aquoso de *A. brasiliensis* em camundongos BALBc, portadores de Sarcoma Meth A, camundongos ICR e atímicos KSN (FUJIMIYA *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2003b; MIZUNO *et al.*, 2003; TAKIMOTO *et al.*, 2004). Células NK são derivadas da medula óssea e como não necessitam de sensibilização prévia e não tem restrição ao MHC possuem atividade citotóxica contra células tumorais ou infectadas por vírus, participando da resposta imune inespecífica. Estas células são produtoras de IFN- γ , que por sua vez, é um potente ativador de macrófagos (GREENBERG, 1994; SCHREIBER, 1999). Os resultados apresentados pelo grupo A50 demonstram a produção desta interleucina, conforme observado na Tabela 16, entretanto a não detecção desta citocina no grupo A100 pode ser em função de uma super exposição aos compostos bioativos do cogumelo, que então podem levar a um efeito nulo ou até contrário, semelhante ao observado no caso de exposição a altas doses de determinados fármacos (GREENLAND; ROBINS, 1994).

Macrófagos e fagócitos ativados podem produzir MCP-1, e interessante, não foi detectada a presença desta interleucina em nenhum dos grupos. MCP-1 é uma quimiocina produzida por leucócitos, células endoteliais e epiteliais, e fibroblastos e possui várias funções, como aumentar a afinidade entre as integrinas de leucócitos e ligantes presentes na parede vascular dos tecidos, quimioatrativa para leucócitos, regulação do movimento de linfócitos B e T, e células dendríticas através dos linfonodos e baço. Neste trabalho, com o micélio na dosagem de 29% e 14,5%, grupos A100 e A50 respectivamente, não foi observada a presença de MCP-1, entretanto em outras pesquisas realizadas com extrato aquoso do corpo de frutificação do cogumelo *A. brasiliensis* promoveu aumentos desta citocina (FUJIMIYA *et al.*, 1998).

A presença de IL-6 no grupo A100S pode ter sido em função da ativação da via 2, através de células *Th* do tipo 2, CD ou células citotóxicas CD8⁺, que aumentaram significativamente neste grupo. A IL-6 é produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos e fibroblastos e estimula a produção de células de imunoglobulina B, a proliferação de células T, a ativação do mecanismo natural de morte celular e citotoxicidade (DETOURNAY *et al.*, 2005).

IFN- γ pode ser produzido por células NK, por células *Th* e por células T citotóxicas (STITES, 1992). A detecção de IFN- γ com valores de 4.3 pg/mL, ocorreu no grupo A50-S, e sua produção pode ter sido em função da ativação da via 1, através de células *Th* do tipo 1 TCD4⁺, que aumentaram significativamente neste grupo.

A menor dosagem testada, com 2,9%, resultou em aumentos na concentração do IFN- γ e da IL-6, no plasma dos animais do grupo A10. Entretanto, as respostas celular e humoral não foram ativadas, pois as concentrações de células *Th*, T citotóxicas e B não apresentaram alterações significativas.

A dosagem de 2,9% do cogumelo na dieta do grupo A10S, na presença do S-180 resultou em uma atividade antitumoral de 46,25%. Nestes animais foi observada a participação da via 2, pela ativação da resposta humoral, com aumento das células CD19⁺ apenas ao nível de linfonodos axilares. E também ocorreu participação da resposta imunológica inespecífica, pelo aumento de células NK CD16⁺:32⁺, tanto ao nível de baço como de linfonodos axilares. Um efeito modulador foi observado sobre a resposta celular, que apresentou aumentos nas células *Th* e T citotóxicas nos linfonodos axilares, mas não no baço, onde foi verificada uma diminuição destas células.

A detecção da IL-6 no grupo A10 demonstra que o cogumelo *A. brasiliensis* pode ter estimulado outras células na produção desta citocina, pois as células *Th* não apresentaram alteração em seu número neste tratamento. Recentes pesquisas demonstraram que células dendríticas, *in vitro*, superexpressam o gene da IL-6 e secretaram grandes quantidades desta interleucina, que atua regulando o efeito supressor de células T CD4⁺:CD25⁺, controlando a produção de IFN- γ (HEINRICH *et al.*, 1990; DETOURNAY *et al.*, 2005). Outros estudos também relataram aumentos na expressão de IL-1 e IL-6 por macrófagos peritoneais e células esplênicas (NAKAJIMA *et al.*, 2002). Estes autores propuseram que o extrato do cogumelo ativou as células T e os macrófagos na produção desta interleucina, que está associada com a diferenciação de células B imaturas a células B produtoras de antígenos, e por isso ocorreu o aumento da produção de anticorpos.

Acredita-se que as células *Th* virgens produzam principalmente IL-2 ao se encontrar pela primeira vez com o antígeno, então ocorre sua diferenciação em células denominadas *Th*₀ para depois ocorrer nova diferenciação em células *Th*₁ ou *Th*₂ (SZABO *et al.*, 2003). IL-12 e IFN- γ promovem a diferenciação da população das células *Th*₀ em *Th*₁ enquanto a IL-4 o faz para *Th*₂ (OKAMURA *et al.*, 1995; MAGRAM *et al.*, 1996; SMYTH *et al.*, 2000). Assim, o aumento da concentração plasmática de IFN- γ no grupo A10 sugere uma ativação das células *Th*₁ (Tabela 17).

A diferença de resultados obtida na ativação de algumas células como *Th* ou T citotóxicas, ou células B, e presença ou ausência de algumas citocinas entre os experimentos aqui relatados, se comparados entre eles ou com os encontrados na literatura podem estar associada à forma de administração ou a dosagem dos princípios ativos presentes no micélio do cogumelo, que neste caso foi via oral. A literatura científica ressalta a importância da correlação entre a dependência da atividade imunomodulatória de drogas como lipopolissacarídeos e glicoproteínas com a dose, forma de administração, e local de atuação destes biomoduladores (TRINCHIERI, 2003). Ainda, é possível que o cogumelo exerça seu efeito imunoestimulante principalmente na presença de agentes deletérios ao organismo, como tumores ou gordura saturada. Assim, a não detecção e ou não ativação de algumas respostas imunes pode ser compreendido como um efeito benéfico em organismos normais, onde uma superestimulação poderia iniciar doenças autoimunes. Este dado é importante dentro do contexto de uso preventivo ou como alimento nutracêutico ou funcional que é feito do cogumelo *A. brasiliensis* em países como o Japão, China e Brasil (CALPIS, 2001; AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2004).

Por outro lado, o efeito imunomodulador verificado nos animais normais dos grupos A100, A50 e A10, com pequenas alterações na concentração de citocinas como TNF- α , ou IFN- γ , ou ainda a presença de aumentos ou decréscimos na população de células B indicam que o micélio do cogumelo exerceu um leve efeito imunoestimulante, o que induz o sistema imune a estágio de alerta, dando suporte assim ao seu uso preventivo para várias doenças.

Os macrófagos peritoneais dos camundongos do grupo A10, que receberam o cogumelo na dose de 2,9% não apresentaram aumentos na atividade fagocitária e de volume lisossomal (Figura 46), entretanto, foi observado um decréscimo na produção de espécies reativas, como o ânion superóxido e de óxido nítrico. No plasma destes animais foi observado aumentos de IL-6 e IFN- γ ($P < 0.05$). IL-1 e TNF são citocinas pró-inflamatórias, enquanto a IL-4, IL-10, e IL-13 são consideradas antiinflamatórias porque suprimem os genes das citocinas proinflamatórias. O IFN- γ é um exemplo da natureza pleiotrópica das citocinas pois possui atividade antiviral, mas também é considerado uma citocina pró-inflamatória porque aumenta a atividade do TNF e induz o óxido nítrico (NO) (DINARELLO, 2000). A concentração de TNF- α no plasma dos camundongos do grupo A10 não apresentou alterações e ocorreu redução na produção do NO pelos macrófagos peritoneais. Estes resultados sugerem que a dieta suplementada com o cogumelo *A. brasiliensis* induziu a um efeito antiinflamatório nestes camundongos.

Os produtos derivados de cogumelos podem estimular os macrófagos e liberar citocinas inflamatórias como IL-1, IL-10, IL-12, entre outras. Além disso, outras pesquisas indicam que o extrato de cogumelos pode inibir a produção de TNF- α por macrófagos estimulados com LPS (LULL; WICHERS; SVELKOU, 2005). Os macrófagos dos animais do grupo A10, *in vitro*, aumentaram a produção de IL-12 e reduziram a de TNF- α , MCP-1 e IL-6 quando comparados aos camundongos que receberam ração controle (Tabela 18). Os ensaios *in vitro* permitiram o estudo da atividade dos macrófagos sem a interferência das outras células imunes como ocorre no organismo *in vivo*. Possivelmente esta é a razão das diferenças entre as concentrações de citocinas encontradas no sobrenadante dos macrófagos *in vitro* e do plasma (Tabela 17). Desta forma, resultados obtidos com os experimentos de suplementação crônica *in vitro* devem ser analisados com cuidado e não podem ser transferidos para situações *in vivo*. Desta forma está claro que a secreção de citocinas ocorre de maneira diferente quando estudados *in vivo* e *in vitro*.

Os resultados de aumento na produção de IL-12 por macrófagos, *in vitro*, dos camundongos do grupo A10 corroboram outros estudos realizados. KASAI *et al.*,

(2004) reportaram que o extrato do micélio de *A. brasiliensis* induziu monócitos peritoneais humanos, *in vitro*, a produzirem IL-12 principalmente por células CD14, que são monócitos e macrófagos imaturos. Os trabalhos de MIZUNO *et al.*, (2003) relatam aumento na produção de IL-12 por macrófagos, *in vitro*, na presença de um composto isolado do extrato aquoso do cogumelo. ELLERTSEN *et al.*, (2006) demonstraram ativação dos genes relacionados com as respostas inflamatórias (IL-12 e TNF) em monócitos humanos tratados com o extrato de *A. brasiliensis*.

A produção de TNF- α no sobrenadante dos macrófagos apresentou uma redução (Tabela 18), diferentemente do que foi observado em outros estudos com o extrato aquoso do micélio e com o polissacarídeo produzido por cultura submersa de *A. brasiliensis* que ocasionou aumentos na produção desta citocina por macrófagos *in vitro* (SORIMACHI *et al.*, 2001a, SHU *et al.*, 2003). Possivelmente, a diferença entre os resultados deve estar atrelada ao método e princípio ativo utilizado, pois os macrófagos usados são de camundongos que receberam a suplementação do cogumelo, grupo A10, enquanto aqueles autores utilizaram macrófagos de camundongos tratados com ração normal e colocados *in vitro* frente ao polissacarídeo ou extrato do cogumelo.

Macrófagos podem em sinergia com IL-4 e IL-10 suprimir a indução de iNOS (ADAMS, 1996; DAVIES; FULTON; HAGEN, 1995). A iNOS é induzida por citocinas como α -TNF, IL-1b, ou γ -IFN e LPS ou endotoxinas bacterianas, no endotélio e na musculatura lisa. A iNOS produz grande quantidade de NO que tem efeito citostático e atua em parasitas e células tumorais. A indução de iNOS é responsável pelas propriedades citotóxicas de NO (DAVIES *et al.*, 1995; ADAMS, 1996).

A angiotensina II é uma das substâncias que produzem a liberação do NO; em contrapartida, substância como os radicais livres e peróxidos lipóides inibem sua síntese. Os radicais livres de oxigênio estão relacionados com várias patologias neurais: enfermidade de Alzheimer, de Parkinson, esquizofrenia, ataques cerebrais e perda neuronal durante isquemia cerebral. Na presença ou produção de moléculas antioxidantes ocorre inibição da ação dos radicais livres, e conseqüente neutralização

dos efeitos do NO (MANZANO *et al.*, 2004). NOSRATOLA *et al.*, (2000), demonstraram que o uso de antioxidantes em ratas Wistar normais melhorou a hipertensão, sem efeitos sobre a pressão arterial e na excreção renal de nitritos e nitratos. *Agaricus brasiliensis* é uma excelente fonte de antioxidantes. O extrato aquoso deste cogumelo contém uma complexa mistura de componentes termoestáveis, com forte atividade “scavenging” *in vitro* e redução dos níveis de oxidação celular (IZAWA; INOUE, 2004). KAKUTA *et al.*, (2000) também reportaram que o extrato aquoso de *Agaricus brasiliensis* contém substâncias efetivas na auto-oxidação do ácido linoléico.

HAQUE e MAJID (2004) sugerem que o mecanismo da angiotensina II – mediada pela ação renal vascular – envolve a geração concomitante de radicais superóxido (O_2^-), que levam a uma vasoconstricção renal e decréscimos no fluxo urinário e na excreção de sódio, por efeitos diretos ou pelo efeito redutor do óxido nítrico (NO). O NO, denominado de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) é um gás simples liberado a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina, por ação da enzima óxido nítrico sintetase, que possui três isoformas, duas delas são dependentes do cálcio e a iNOS - independente de cálcio e é produzida por macrófagos e polimorfos nucleares (PMN) nos músculo liso e endotélio vascular. A iNOS é induzida pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas que produzem grandes concentrações de NO que são citotóxicas e citostáticas para células brancas. As citocinas relacionadas com os linfócitos Th_1 como IL-2 e INF- γ , estimulam os macrófagos a produzirem grandes quantidades de NO, por outro lado, as citocinas produzidas por linfócitos Th_2 como IL-4 e IL-10 regulam negativamente a produção de NO. O efeito sinérgico de INF- γ e TNF- β induzem a capacidade citotóxica dos macrófagos contra tumores e microorganismos ao induzir a expressão de iNOS (CHANGO *et al.*, 2005). SORIMACHI *et al.*, (2001a), concluíram que *Agaricus brasiliensis* possui componentes que ativam macrófagos resultando na indução de secreção de citocinas e de NO *in vitro*.

O NO pode reagir com o superóxido e produzir o ânion peroxinitrito e dióxido de nitrogênio, que podem iniciar a peroxidação lipídica e potencializar a lesão

inflamatória em células vasculares (OECKLER; WOLIN, 2000; O'DONNEL; FREEMAN, 2001). O cogumelo *A. brasiliensis* promoveu alteração na atividade dos macrófagos peritoneais em camundongos com dieta suplementada de 2,9% do micélio de cogumelo e com 5% de lipídeos saturados, grupo A10Lip, com aumento da fagocitose ($P<0,05$), redução para volume lisossomal e peróxido de hidrogênio, entretanto sem diferenças estatísticas (Figura 47). A redução de produção de NO ocorreu tanto na ausência como na presença de LPS.

SORIMACHI e colaboradores também verificaram que o cogumelo ocasiona alterações na produção de NO. Em macrófagos frente a frações etanólicas obtidas do corpo frutífero foi verificada ausência de indução na produção do NO. Já frações subsequentes com concentrações maiores de etanol estimularam os macrófagos a produzirem concentrações mais elevadas do NO que do grupo controle (SORIMACHI *et al.*, 2001a). Os resultados do experimento e relatados na Figura 47, com suplementação de ácidos graxos saturados e micélio, demonstraram que o cogumelo possui a capacidade de induzir aumentos na produção de NO no grupo A10Lip+LPS, se comparado com a mesma dieta sem cogumelos, grupo CLip+LPS.

O NO age como barreira fisiológica, pois inativa o ânion superóxido citotóxico, que é produzido continuamente por todas as células, e que pode inativar mastócitos. O NO e o superóxido parecem regular a aderência de leucócitos ao endotélio: a inibição de NO leva ao aumento no nível de antioxidantes e ativação de mastócitos que se desgranulam e aumentam a permeabilidade vascular (KUBES *et al.*, 1993). Pesquisas com o extrato do cogumelo *G. lucidum* indicaram sua capacidade de redução na produção de NO, mediado via ação antioxidante (WOO *et al.*, 2005). Pesquisas apontam para o excelente potencial antioxidante do cogumelo *A. brasiliensis*, pois a presença de várias moléculas, como ácido ascórbico, α , β e δ -tocoferol, e compostos fenólicos possibilitam atividade antioxidante, habilidade redutora, quelante e “scavenging” (HUANG *et al.*, 1999; IZAWA; INOUE, 2004; KER *et al.*, 2005). Assim, é possível que a capacidade antioxidante de *A. brasiliensis* possa ter influenciado sinergisticamente com o efeito hipolipidêmico observado e com as alterações ocorridas com os macrófagos.

5- CONCLUSÃO

O cogumelo *A. brasiliensis* foi cultivado na sua fase vegetativa de micélio, sobre o substrato trigo em grãos e trigo granulado (“tipo para quibe”) para obtenção de material cultivado no estado sólido. O inóculo foi obtido por cultivo submerso e a etapa de peneiramento da biomassa possibilitou a produção de inóculo na forma de micélio fragmentado que por sua vez propiciou rápido desenvolvimento micelial sobre o trigo, reduzindo o tempo de cultivo de 30 dias para 14 a 18 dias.

A dosagem de ergosterol demonstrou ser uma técnica viável para determinação da biomassa obtida por cultivo submerso, que resultou em 6,936 mg de ergosterol .g⁻¹ de biomassa (base seca). A biomassa produzida por cultura em meio sólido foi estimada a partir da correlação de quantidade de ergosterol presente na biomassa obtida por cultivo submerso e da dosagem de ergosterol no material cultivado; e o resultado obtido foi de 0,291 g de biomassa fúngica por grama de material cultivado, em base seca, o que corresponde a 29% de biomassa fúngica no material cultivado.

A análise respirométrica do cultivo em meio sólido em grãos de trigo em colunas com aeração forçada, com duração de 312 horas, resultou em um pico de produção de CO₂ de 7,48 μmol, com estimativa de taxa de consumo de O₂ de 6,22 μmol e ocorreu às 69 horas de cultivo. O valor mediano do coeficiente de respiração (QR) foi de 1,07. A partir dos valores da taxa de consumo do O₂ e da produção de CO₂, obtidos experimentalmente, e com uso do programa Fersol, foi determinado o rendimento da biomassa ($Y_{X/O}$) em 1,949g de biomassa por g de O₂ consumido e um coeficiente de manutenção de biomassa (m_x) de 0,0027 g de O₂ consumido por g de biomassa produzida por h. A produção máxima de biomassa estimada ocorreu às 242 horas de cultivo com X de 24,08 g.100g⁻¹. A velocidade específica de crescimento (μ) foi de 0,087 h⁻¹; e em 18 h de cultivo o $\mu_{\text{máx}}$ alcançou o valor de 0,1617 h⁻¹.

O micélio do cogumelo *A. brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido, em grãos de trigo, originou o material cultivado utilizado na formulação de ração e incorporado na dieta dos camundongos. Três dosagens de rações contendo o material cultivado e com as seguintes porcentagens de micélio foram testadas: 29% (grupo

A100), 14,5% (grupo A50) e 2,9% (grupo A10), na ausência e presença do Sarcoma-180, para avaliação de seu efeito no metabolismo e ação imunoduladora. Os animais que receberam a dosagem de 14,5% do micélio na dieta apresentaram tendência de maior ganho de peso, e com a dosagem de 29% o ganho de peso foi um pouco menor, porém maior do que do grupo Controle. A dosagem de 2,9% não apresentou alteração no ganho de peso.

A função renal apresentou indícios de normalidade, sem alterações importantes para creatinina, uréia e ácido úrico na urina e proteínas totais, albumina e globulina no plasma, para os camundongos tratados com as dosagens de 29% e 14,5% de micélio na dieta. A função hepática não apresentou alterações significativas, entretanto o aumento nas concentrações das enzimas TGO e TGP e a presença de pigmentos biliares na urina para o grupo A50 indicam a necessidade de novas pesquisas para comprovar a total ausência de toxicidade hepática do micélio do cogumelo *A. brasiliensis*.

O cogumelo apresentou uma tendência de redução nos valores da glicose plasmática na dosagem de 2,9% de micélio na dieta de camundongos normais. Na presença do S-180 e com a dosagem de 14,5% de micélio foi observada inibição na redução da concentração de glicose plasmática.

Importantes alterações ocorreram no metabolismo lipídico dos camundongos normais com as dosagens de 29% e 14,5% de micélio de *A. brasiliensis*, com atividade hipolipídica, hipotriacilglicérica, hipocolesterolêmica e de aumentos nos valores do HDL-colesterol, com conseqüentes decréscimos na relação triacilgliceróis: HDL-colesterol, no índice aterogênico e no risco de doenças cardiovasculares. A dosagem de 2,9% de micélio ocasionou aumentos nos valores do HDL-colesterol e redução no índice aterogênico. Na presença do Sarcoma-180 e com as dosagens de 29% e 14,5% de micélio de *A. brasiliensis* foi constatado um efeito redutor para lipídeos totais, triacilglicerídeos e VLDL-colesterol. Na presença de dieta rica em gorduras saturada o cogumelo inibiu o aumento nos valores de lipídeos totais, com aumento na concentração de HDL-colesterol e redução de triacilglicerídeos, de VLDL-colesterol, e na relação triacilgliceróis: HDL-colesterol.

A presença do cogumelo *A. brasiliensis* na dieta de animais normais ocasionou efeito estimulante sobre o sistema imunológico, com ativação da resposta humoral pelo aumento da população de células B (CD19⁺) e participação da imunidade inespecífica pelo aumento da população de células NK (CD16:32⁺) nas dosagens de 29% e 14,5%. O micélio do cogumelo induziu a produção de TNF- α e redução de células T *helper* (CD4⁺) e de células citotóxicas ativadas (CD8:25⁺) nos linfonodos axilares. A dosagem de 2,9% não apresentou efeitos de estímulo ou supressão sobre as células T *helper* (CD4⁺), T citotóxicas (CD8⁺), células B (CD19⁺) e NK (CD16:32⁺), apenas aumentos na concentração da IL-6 e IFN- γ .

Na presença do S-180, o cogumelo propiciou uma atividade antitumoral, com participação e ativação da resposta celular, detectado pelo aumento de células Th (CD4⁺) nas dosagens de 14,5% e 2,9% apenas ao nível de linfonodos axilares. Foram verificados aumentos na população de células T citotóxicas (CD8⁺) com as três dosagens testadas. A atividade imunoestimulante teve a participação da resposta humoral, como aumento de células B (CD19⁺) com as dosagens de 29% e 2,9% de micélio, entretanto ocorreu uma imunossupressão com a dosagem de 14,5% para estas células. O cogumelo também ocasionou ativação da imunidade inespecífica, com aumentos das células NK (CD16:32⁺) nas dosagens de 29% e de 2,9%, e novamente suprimiu a ação destas células na dosagem de 14,5% de micélio na dieta.

Nos experimentos *in vitro*, com macrófagos peritoneais dos camundongos do grupo A10 foi detectada redução na produção ânion superóxido e de óxido nítrico, sem alterações para a fagocitose, volume lisossomal e peróxido de hidrogênio. Na presença de lipídeos saturados na dieta com a dosagem de 14,5% também foi observada redução na produção de óxido nítrico, com aumentos para a fagocitose.

A ação imunomoduladora do cogumelo resultou em uma atividade antitumoral de 8,1% para o grupo A100, com dosagem de 29% de micélio, de 55,23% para o grupo A50 com 14,5% de micélio, e de 46,25% no grupo A10, com a dosagem de 2,9% de micélio.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados deste trabalho que ainda não foram totalmente elucidados ou que indicaram novas possibilidades e teorias permitem as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Realização de testes de toxicidade subaguda e crônica do produto cultivado em animais.
- Realização de testes *in vivo* com dosagens menores, como 5% e 1% do micélio produzido por cultura sólida em trigo para verificar sua ação imunomoduladora e antitumoral.
- Pesquisas *in vivo* com animais diabéticos para verificar sua ação hipoglicêmica ou anti-hiperglicêmica.
- Pesquisas para detecção da possível presença de estatina ou do princípio ativo presente no micélio com atividade hipolipidemiante.
- Extração, caracterização e purificação das substâncias bioativas produzidas, em especial exopolissacarídeos e glicoproteínas, com testes *in vitro* e *in vivo* para verificar sua eficiência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed. 4ª revisão. 1998.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PORBER, J. S. **Imunologia celular & molecular**. 3.ed. RJ.: Revinter, 2000. 486 p.
- ADAMS, H. R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **J. Am. Med. Assoc.**, 1996; 209:1297-302
- AGARICUS. Disponível em: <<http://www.mbc.ntu.edu.tw/faculty/image/Agaricus.jpg>> Acesso em: 20 out. 2004.
- AHN, W. S.; KIM, D. J.; CHAE, G. T.; LEE, J. M.; BAES, S. M.; SIN, J. I.; KIM, Y. W. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murril Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 14, p.589-594, 2004.
- AKITA. Disponível em: <<http://www.akita-pu.ac.jp>> Acesso em: 25 out. 2005.
- AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **J. Amer. Diet. Assoc. U.S.A.**, v. 104, p. 814-826, 2004.
- ATTA, A. M.; MAGALHAES, L. A.; RANGEL, H. A. *Schistosomiasis mansoni*: II - evolution of the levels of serum proteins and of their electrophoretic pattern as traced by quantitative immunoelectrophoresis. **Rev. Saúde Pública**, v.15, no.2, p.194-204, 1981.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p.245-252, 1998.
- BARBISAN, L. F.; MIYAMOTO, M.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; EIRA, A. F.; CAMARGO, J. L. V. Influence of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **J. Ethnopharmacol.**, v.83, p. 25-32, 2002..
- BARBISAN, L. F.; SPINARDI-BARBISAN, A. L. T.; MOREIRA, E. L. T.; SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; EIRA, A. F.; CAMARGO, J. L. V. *Agaricus blazei* (Himematsutake) does not alter the development of rat diethylnitrosamine-initiated hepatic preneoplastic foci. **Cancer Sci.**, v. 94 (2), p. 188-192, 2003
- BELLINI, M. F.; GIACOMINI, N. L.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different development phases of the mushroom. **Toxicol. in vitro**, v. 17, p. 465-469, 2003.

BERNARDSHAW, S.; JOHNSON E.; HETLANDY, G. An Extract of the Mushroom *Agaricus blazei* Murill Administered Orally Protects Against Systemic Streptococcus pneumoniae Infection in Mice. **Scand. J. Immunol.**; v. 62, p. 393–398, 2005.

BERTOLAMI, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 25-27, 2005.

BIANCHI, M.; SACERDOTE, P.; PANERAI, A. E. Cytokines and cognitive function in mice. **Biol. Signals Receptors**, v. 7, n. 1, p. 45-54, 1998.

BIOMED, 2001. Disponível em: <<http://boasaude.uol.com.br/lib>> Acesso em: 05 mai. 2005.

BIRCH, D. F.; FARLEY, K. F.; BECKER, G. J. (2001). **Microscopia urinária-Texto e Atlas**, Editorial Premiere, Brasil.

BLACK, J.G. **Microbiologia – fundamentos e perspectivas**. 4 ed. RJ: Guanabara Koogan, 2002, 829 p.

BLOCK, S. S.; STEARNS, T. W.; STEPHENS, R. L.; MCCANDLESS, R. F. J. Mushroom mycelium – experiments with submerged culture. *Agricultural and Food Chemistry*, v. 1, p. 890-893, 1953 in CHANG, HL; CHAO, GR; CHEN, CC; MAU, JL. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. **Food Chemistry**, v. 74, p. 203-207, 2001.

BOBEK, P.; GALBAVY, S. Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits, **Nahrung**, v. 43, p. 339-342, 1999.

BOBEK, P.; OZDIN, L.; KUNIAK, L. Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and its ethanolic extract in diet on absorption and turnover of cholesterol in hypercholesterolemic rat. **Nahrung**, v. 40, p. 222–224, 1996.

BOLETIM DE MERCADO. Disponível em: <<http://www.brasemb.or.jp/porutogatu/relac/secom/agaricus.PDF>> Acesso em: 31 out. 2006.

BONATTO, J. R. S.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; PIZATTO, N.; OLIVEIRA, H. H. P.; VECCHI, R.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L.C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cell Immunol**, v. 231, p. 56–62, 2004.

BORSCHERS, A. T.; KEEN, L. C.; GERSHWIN, M. E. Mushrooms, tumors and immunity: an update. **Exp Biol Med**, v. 229, p. 393-406, 2004.

BOURA, P.; KONTOURAS, J.; LYGIDAKIS, N. J. Tumor immunity and immunotherapy. **Hepato-Gastroenterology**, v. 48, p. 1041-1044, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, G. P. **Manual de cultivo de Agaricus blazei Murr. “Cogumelo do Sol”**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais/Unesp, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Estimativa 2006 Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer - INCA, 98 p. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Falando sobre Câncer do Intestino, Rio De Janeiro, 38 p., 2003.

BRASIL. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>> Acesso em: 18 abr. 2004.

BRASIL.. Alimentos e Substâncias Bioativas com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde e Novos Alimentos. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 01 jul. 2003.

BRASIL.. Procedimentos sobre cogumelos. Informe técnico n. 6, de 31 de janeiro de 2003 Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 03 jul. 2003.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo – Patologia Geral**. RJ.: Guanabara Koogan, 1998.

BRAUN, M. C.; LAHEY, E.; KELSALL, B. L. Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3009-3017, 2000.

BRENNER, B. M.; LEVINE, S. A. (2004), **Brenner & Rector The Kidney**; 7. ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R , **Tietz - Fundamentos de Química Clínica**, Editora Guanabara-Koogan, Brasil., 1998.

CALPIS CO. LTD., Masuyama, A. *et al.*, **Physiologically functional food having brain function-improving, learning ability-enhancing, and memory-enhancing functions** A23C 009/12; A01N 063/00; A23L 001/31; C12N 001/00 U.S. n. 6,284,243. July 10, 1996; September 4, 2001.

CALVERT, J. W.; LEFER D. J. Statin therapy and myocardial no-reflow. **Br. J. Pharmacol.**, v. 149, p. 229-231, 2006.

CAMELINI, C. M.; MARASCHIN, M.; MENDONÇA, M. M.; ZUCCO, C.; FERREIRA, A. G.; TAVARES, L. A. Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. **Biotechnol. Let.**, v. 27, p. 1295-1299, 2005a.

CAMELINI, C. M.; MENDONÇA, M.; DIAS P. F.; MARASCHIN, M. β -GLUCANAS DO COGUMELO *Agaricus subrufescens* Peck (sinonímia *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinemann, = *Agaricus brasiliensis* Wasser, Diduck, de Amazonas & Stamets): Extração, análise de rendimento, estrutura química e atividade biológica. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 35, p. 36-47, 2005b.

CARVALHO, J. C.; OISHI, B. O.; BRAND, D.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Relation between growth, respirometric analysis and

biopigments production from *Monascus* by solid substrate fermentation. **Biochem. Eng. J.** v. 29, p. 262-269, 2006.

CHAN, K. K. W.; OZA, A. M.; SIU, L. L. The Statins as Anticancer Agents. **Clinical Cancer Res.**, v. 9, p. 10-19, 2003.

CHANG, H. L.; CHAO, G. R.; CHEN, C. C.; MAU, J. L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. **Food Chemistry**, v. 74, p. 203-207, 2001.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. Mushroom biology – a new discipline. **Mycologist**, v. 6, p. 64-65, 1992.

CHANGO, D.; CHÁVEZ, R.; CHILIUSA, P.; CHUQUIÁN, D.; DUEÑAS, A. Acciones del NO (Oxido Nitrico)., 2005. Disponível em: <<http://www.monografias.com/trabajos16/oxido-nitrico/oxido-nitrico.shtml>> Acesso em: 24 mar. 2005.

CHEN, A. Cultivation of *Agaricus blazei* Murrill, a mushroom of culinary and biomedical importance. **Int. J. Med. Mushr.**, v. 3, p. 128-135, 2001.

CHEN, J.; MA, A.; YOUNG, F.; ALT, F. W. IL-2 receptor α chain expression during early B lymphocyte differentiation **Int. Immunol.**, v. 6; p. 1265-1268, 1994.

CHEN, L.; SHAO, H. J. Extract from *Agaricus blazei* Murill can enhance immune responses elicited by DNA vaccine against foot-and-mouth disease. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 109 p. 177-82, 2006.

CHEN, L.; SHAO, H. J.; SU, Y. B. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus core protein trough DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses. **Int. Immunopharmacol.**, v.4, p.403-409, 2004.

CHEUNG, P. C. K. Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in hamsters fed straw mushroom diets. **J Nutr.**, v. 128, p. 1512-1516, 1998.

CHEUNG, P. C. K. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom, **Nutr. Res.**, v. 16, p. 1953-1957, 1996a.

CHEUNG, P. C. K. The hypocholesterolemic effect of two edible mushroom: *Auricularia auricula* (Tree-ear) and *Tremella fuciformis* (White-jelly leaf) in hypercholesterolemic rats, **Nutr. Res.**, v. 16, p. 1721-1725, 1996b.

COLAUTO, N. B.; DIAS, E. S.; GIMENES, M. A.; da EIRA, A. F. Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 131-133, 2002.

COLIGAN, J. E.; KRUISBEEK, A. M.; MARGULIES, D. H.; SHEVACH, E. M.; STROBER, W. (2002) **Current protocols in immunology**, New York: John Wiley, p 3×22×1–3×22×6.

- DAVIES, M. G.; FULTON, G. J.; HAGEN, P. O. Clinical biology of nitric oxide. **Br. J. Surg.**, v. 82, p. 1598-610, 1995.
- DEBRICK, J. E.; CAMPBELL, P. A.; STAERZ, U. D.. Macrophages as accessory cells for class I MHC-restricted immune responses. **J. Immun.** v. 147, p. 2846–2851, 1991.
- DELMANTO, R. D.; LIMA, P. L. A.; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mut. Res.**, v. 496, p. 15-21, 2001.
- DETOURNAY, O.; MAZOUZ, N.; GOLDMAN, M.; TOUNGOUZ, M. IL-6 Produced by Type I IFN DC Controls IFN- γ Production by Regulating the Suppressive Effect of CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells. **Hum. Immunol.**, v. 66, p. 460-468, 2005.
- DIAS, E. S.; ABE, C.; SCHWAN, R. F. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Sci. Agri.**, v. 65, n. 5, p. 545-549, 2004.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory Cytokines. **Chest**, v.118, p. 503-508, 2000.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.
- DOBIASOVA, M.; FROHLICH, J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FERHDL). **Clin Biochem.**, v. 34, p. 583-8, 2001.
- DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X.; FANG, J. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei*. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 1417-1421, 2002.
- EBINA, T.; FUJIMIYA, Y. Antitumor effect of a peptideglucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. **Biotherapy**, v, 11, p. 259-265, 1998.
- ELLERTSEN, L. K.; HETLAND, G.; JOHNSON, E.; GRINDE, B. Effect of a medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill on gene expression in a human monocyte cell line as examined by microarrays and immuno assays. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, p.133-43, 2006.
- EMTAGE, P. C.; CLARKE, D.; GONZALO-DAGANZO, R.; JUNGHANS, R. P. Generating potent Th1/Tc1 T cell adoptive immunotherapy doses using human IL-12: harnessing the immunomodulatory potential of IL-12 without the in vivo-associated toxicity. [published correction appears in **J. Immunother.**, **J. Immunother.**, v. 26, p. 97-106, p. 290, 2003.
- ENGEL, P.; ZHOU, L. J.; ORD, D. C.; SATO, S.; KOLLER, B.; TEDDER, T. F. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the Cd19 signal transduction molecule. **Immunity**, v. 3, p.39-50, 1995.

- FAN, L. Production of extra-cellular polyssacharide from *Agaricus blazei* by submerged and solid state fermentation and its antitumor effect. 2002. Tese, Doutorado em Processos Biotecnológicos.
- FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; GERMANO, S.; RAU, R.; PEDROSO, A.; SOCCOL, C. R. Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser *et al.*, LPB 03 (Agaromycetidae) in submerged fermentation and its antitumor effect, **Int. J. Med. Mushr.** v.5, p. 17-23, 2003.
- FERNANDEZ, M. L. ; VOLEK, J. S. Guinea pigs: A suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. **Nut. Metab.** vol. 3 p. 3-17, 2006.
- FIELD, C. J.; SCHLEY, P. D. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids1–4. **Am J Clin Nutr.**, v. 79, p. 1190S– 8S, 2004.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9^a ed., Atheneu, São Paulo, Br. 307 p.
- FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; OSHIMAN, K.; KOBORI, H.; MORIGUCHI, K.; NAKASHIMA, H.; MATUMOTO, Y.; TAKAHARA, S.; EBINA, T.; KATAKURA, R. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 46, p. 147–159, 1998.
- FUKUDA, M.; OHNO, S.; KATO, M. Genetic variation in cultivated strains of *Agaricus blazei*. **Mycoscience**, v. 44, p. 431-436, 2003.
- FUKUSHIMA, M.; NAKANO, M.; MORII, Y.; OHASHI, T.; FUJIWARA, Y.; SONOYAMA, K.. Hepatic LDL Receptor mRNA in Rats Is Increased by Dietary Mushroom (*Agaricus bisporus*) Fiber and Sugar Beet Fiber. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2151–2156, 2000.
- GOFMAN, J. W. Serum lipoproteins and the evaluation of atherosclerosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 64, p. 590–595, 1956. in: STEINBERG, D. The pathogenesis of atherosclerosis. An interpretative history of the cholesterol controversy: Part I. **J. Lipid Res.**, v. 45, p. 1583-1593, 2004.
- GONG, P.; GUAN, X.; WITTER, E. A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption. **Applied Soil Ecol.**, v 17, p. 285–289, 2001.
- GONZAGA, M. L. C.; RICARDO, N. M. P. S.; HEATLEY, F.; SOARES, S. A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. **Carbohydr. Polymers**, v. 60, p. 43-49, 2005.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- GREENBERG, P. D. Mechanisms of tumor immunology. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Basic Clin. Immunol.** 8 ed. London: Printice-Hall International Inc., 1994, p. 567-577.

- GREENLAND, S.; ROBINS, J. M. Adjusting for Differential Rates of Prophylaxis Therapy for PCP in High- versus Low-Dose AZT Treatment Arms in an AIDS Randomized Trial, **J. Amer. Statist. Assoc.** 89 (1994) 737-749.
- GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales S.R., Basidiomycetes). **Int J Med. Mushr.**, v. 1, p. 69-80, 1999.
- GUNDE-CIMERMAN, N.; PLEMENITAS, A. Hypocholesterolemic activity of the genus *Pleurotus* (Fr.) Karst. (*Agaricales s.l. Basidiomycetes*), **Int J Med. Mushr.**, v. 3, A91, 2000.
- GUTERREZ, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; JORDÃO, B. Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicol. in vitro**, v. 18, p; 301-309, 2004.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2002.
- HAQUE, M. Z.; MAJID, D. S. A. Assessment of renal functional phenotype in mice lacking gp91phox subunit of NAD(P)H oxidase. **Hypertension**, v. 43, p.335, 2004.
- HARDMAN J. G. LIMBIRD, L. E. 1996. **Goodman & Gilman- As bases farmacológicas da terapêutica**, 9ª edição, Editora McGraw-Hill Interamericana, México.
- HASHIMOTO, T.; NONAKA, Y.; MINATO, K.; KAWAKAMI, S.; MIZUNO, M.; FUKUDA, I.; KANAZAWA, K.; ASHIDA, H. Suppressive effect of polysaccharides from the edible and medicinal mushrooms, *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei*, on the expression of cytochrome P450s in mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, p. 1610-1614, 2002.
- HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUST, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem J.**, v. 265, p. 621-636, 1990.
- HIKIMO, H.; ISHIYAMA, M.; SUZUKI, Y.; KONNO, C. Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: a glycan of *Ganoderma lucidum* fruitbodies. **Planta Medica**, v. 55, p. 423-428, 1989.
- HIROTANI, M.; HIROTANI S.; TAKAYANAGI, H.; YOSHIKAWA, T. Blazeispirol A, an unprecedented skeleton from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. **Tetrahedron Let.**, v. 40, p. 329-332, 1999.
- HIROTANI, M.; HIROTANI, S.; TAKAYANAGI, H.; KOMIYAMA, K.; YOSHIKAWA, T. Agariblazeispirols A and B, an unprecedented skeleton from the cultured mycelia of the fungus, *Agaricus blazei*. **Tetrahedron Let.**, v. 44, p. 7975-7979, 2003.
- HIROTANI, M.; HIROTANI, S.; YOSHIKAWA, T. Blazeispirol X and Y, two novel carbon skeletal sterols from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. **Tetrahedron Let.**, v. 41, p. 5107-5110, 2000a.

- HIROTANI, M.; HIROTANI, S.; YOSHIKAWA, T. D and Z, as the actual intermediates of blazeispirol A biosynthesis from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. **Tetrahedron Let.**, v. 42, p. 5261-5264, 2001.
- HIROTANI, M.; KANEKO, A.; ASADA, Y.; YOSHIKAWA, T. Biosynthesis of blazeispirol A, an unprecedented skeleton from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. **Tetrahedron Let.**, v. 41, p. 6101-6104, 2000b.
- HIROTANI, M.; MASUDA, M.; SUKEMORI, A.; HIROTANI S.; SATO, N.; YOSHIKAWA, T. Agariblazeispirol C from the cultured mycelia of the fungus, *Agaricus blazei*, and the chemical conversion of blazeispirol A. **Tetrahedron Let**, v. 61, p. 189-194, 2005.
- HIROTANI, M.; SAI, K.; HIROTANI, S.; YOSHIKAWA, T. Blazeispirols B, C, E and F, des-*A*-ergostane-type compounds, from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. **Phytochem.**, v. 59, p.571-577, 2002a.
- HIROTANI, M.; SAI, K.; KANEKO, A.; YOSHIHISA, A.; YOSHIKAWA, T. Biosynthetic studies on blazeispirane and protoblazeispirane derivatives from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. **Tetrahedron Let.**, v. 58, p. 10251-10257, 2002b.
- HIROTANI, M.; SAI, K.; NAGAI, R.; HIROTANI, S.; TAKAYANAGI, H.; YOSHIKAWA, T. Blazeispirane and protoblazeispirane derivatives from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. **Phytochem.**, v. 61, p.589-595, 2002c.
- HMDS. Disponível em: <<http://www.hmds.org.uk/mabs.html>> Acesso em: 10 out. 2006.
- HOLME, I. Cholesterol reduction and its impact on coronary artery disease and total mortality. **Am. J. Cardiol.**, v. 76, p. 10-17, 1995.
- HUANG, S. J.; HUANG, L. C.; CHEN, C. C.; MAU, J. L. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*. **ICMBMP**, 1999.
- ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticanc. Res.**, v.17, p. 277-284, 1997.
- ITOH, H.; ITO, H.; AMANO, H.; NODA, H. Inhibitory action of a (1-6)-beta-Dglucan-protein complex (F III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 66, p. 265-271, 1994.
- IWADE KINGAKU KENKYUSHO KK. Ito, H. **Agent for preventing and treating arteriosclerosis, comprises water-soluble composite components isolated from fruiting body of *Agaricus blazei* and/or its processed material as active ingredient.** IPCA61K-035/84; JP 2004359645-A; JP163141, jun 09, 2003; Dec 24, 2004.

- IZAWA, S.; INOUE, Y. Screening system for antioxidants using thioredoxin-deficient yeast: discovery of thermostable antioxidant activity from *Agaricus blazei* Murill. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 537-542, 2004.
- JAMISON, D. T.; BREMAN, J. G.; MEASHAM, A. R.; ALLEYNE, G.; CLAESON, M.; EVANS, D. B.; JHA, P.; MILLS, A.; MUSGROVEP. **Prioridades em saúde**. Banco Mundial, Washington, D.C., 2006, 222 p.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunobiologia – o sistema imunológico na saúde e na doença**. Artmed, 2000.
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; SMIGAL, C.; THUN, M. J. Cancer Statistic-S, 2006. **CA Cancer J Clin.**, v. 56, p. 106-130, 2006.
- JENSEN, W. A.; MARSCHNER, S.; OTT, V. L.; CAMBIER, J. C.; FcγRIIB-mediated inhibition of T-cell receptor signal transduction involves the phosphorylation of SH2-containing inositol-5-phosphatase (SHIP), desphosphorylation of the linker of activated T-cells (LAT) and inhibition of calcium mobilization. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 29, p. 840-846, 2001.
- JOSENS, P. G.; MATTHYS, K. E.; BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Mediat. Inflamm.**, v. 4, p. 75-89, 1995.
- KABIR, Y.; YAMAGUCHI, M.; KIMURA, S. Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats, **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 33, p. 341-346, 1987.
- KAKUTA, M.; TANIGAWA, A.; KIKUZAKI, H.; MISAKI, A. Isolation and chemical characterization of antioxidative substance and glucans from fruiting body of *Agaricus blazei*. **Biryo Eiyouso Kenkyu**, v. 17, p. 83-90, 2000.
- KALINSKI, P.; HILKENS, C. M.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunol. Today** v. 20, p. 561-567, 1999.
- KANENO, R.; FONTANARI, L. M.; SANTOS, S. A.; DI STASI, L. C.; RODRIGUES FILHO, E.; EIRA, A. F. Effects of extract from brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. **Food Chem. Toxicol.**, v.42, p.909-916, 2004.
- KASAI, H.; HE, L. M.; KAWAMURA, M.; YANG, P. T.; DENG, X. W.; MUNKANTA, M.; YAMASHITA, A.; TERUNUMA, H.; HIRAMA, M.; HORIUCHI, I.; NATORI, T.; KOGA, T.; AMANO, Y.; YAMAGUCHI, N. IL-12 production induced by *Agaricus blazei* fraction H (ABH) involves Toll-like Receptor (TLR). **Evidence-based complementary and alternative Medicine**, v.1, n. 3, p. 259-267, 2004.
- KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; MIZUNO, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydr. Res.**, v. 186, p. 267-273, 1989.

- KAWAGISHI, H.; KANAO, T.; INAGAKI, R.; MIZUNO, T. Formolysis of a potent antitumor (1-6)- β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. **Carbohydr. Polymers**, v. 12, p. 393-403, 1990.
- KAWAGISHI, H.; KATSUMI, R.; SAZAWA, T.; MIZUNO T.; HAGIWARA, T. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. **Phytochem.**, v. 27, p. 2777-2779, 1988a.
- KAWAGISHI, H.; NOMURA, A.; YUMEN, T.; MIZUNO, T. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. **Carbohydr. Res.**, v. 183, p. 150-154, 1988b.
- KAWAMURA, M.; KASAI, H.; HE, L.; DENG, X.; YAMASHITA, A.; TERUNUMA, H.; HORIUCHI, I.; TANABE, F.; ITO, M. Antithetical effects of hemicellulase-treated *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunol.**, v. 114, p.397-409, 2005.
- KER, Y. B.; CHEN, K. C.; CHYAU, C. C.; CHEN, C. C.; GUO, J. H.; HSIEH, C.L.; WANG, H.E.; PENG, C. C.; CHANG, C. H.; PENG, R. Y. Antioxidant Capability of Polysaccharides Fractionated from Submerge-Cultured *Agaricus blazei* Mycelia. **J. Agric. Food Chem.**,v. 53, p. 7052-7058, 2005.
- KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom. and its synonyms. **Mycologia**, v. 97, p. 12-24, 2005.
- KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycan in cancer treatment. **Alternat. Med. Rev.**, v. 5, p. 4-27, 2000.
- KIHO, T.; MORIMOTO, H.; SAKUSHIMA, M.; USUI, S.; UKAI, S. Polysaccharides in fungi. XXXV. Anti-diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. **Biol. Pharmaceut. Bul.**, v. 18, p. 1627-1629, 1995.
- KIM, M. W.; PARK, M. H.; KIM, G. H. Effects of mushroom protein-bound polysaccharides on the blood glucose levels and energy metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Korean Nutri.**, v. 30, p. 743-750, 1997.
- KIM, Y. W.; KIM, K. H.; CHOI, H. J.; LEE, D. S. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *A. blazei*. **Biotechnol. Let.**, v. 27, p. 483-487, 2005.
- KIMURA, Y.; KIDO, T.; TAKAKU, T.; SUMIYOSHI, M.; BABA, K. Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murill: Its antitumor and antimetastatic actions. **Cancer Sci.**, v. 95, n. 9, p. 758-764, 2004.
- KOBAYASHI, H.; YOSHIDA R.; KANADA, Y.; FUKUDA, Y.;YAGYU, T.; INAGAKI, K.; KONDO, T.; KURITA, N.; SUZUKI, M.; KANAYAMA, N.; TERAOKA, T. Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 131, p. 527-538, 2005.

- KROP, I.; SHAFFER, A. L.; FEARON, D. T.; SCHLISSEL, M. S. The signaling activity of murine CD19 is regulated during B cell development. **J. Immunol.**, v. 26, p. 238-242, 1996.
- KUBES, P.; KANWAR, S.; NIU, X.; GABOURY, J. P. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. **FASEB J.**, v. 7, p. 1293-9, 1993.
- KUBO, K.; NANBA, H. Anti-hyperliposis effect of maitake fruit body (*Grifola frondosa*). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 20, p. 781-785, 1997.
- KUBO, K.; NANBA, H. The effect of maitake mushrooms on liver and serum lipids. **Altern. Ther. Health Med.**, v. 2, p. 62-66, 1996.
- KUO, Y.; HUANG, Y.; CHEN, C.; LIN, Y.; CHUANG, K.; TSAI, W. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. **J Lab Clin Med.**, v. 140, n. 3, p.176-187, 2002.
- KURASHIME, S.; MITSUHASHI, S. Macrophages activities in Sarcoma 180-bearing mice and EL-4bearing mice. **Gann**, v.73, p.85-90, 1982.
- KUROIWA, Y.; NISHIKAWA, A.; IMAZAWA, T.; KANKI, K.; KIMATURA, Y.; UMEMURA, T.; HIROSE, M. Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill in F344 rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, p.1047-1053, 2005.
- KWON, N. S.; NATHAN, C. F.; GILKER, C.; GRIFFITH, O. W.; MATTHEWS, D. E.; STUEHR, D. J. L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 13442-13445, 1990.
- LABCON.Disponível em: <<http://www.labcon.com.br>> Acesso em: 18 abr. 2004.
- LAI, L.; ALAVERDI, N.; MALTAIS, L.; MORSE III, H. C. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. **J. Immunol.**, v. 160, n.8, p. 3861-8, 1998.
- LAMEIRE, N.; VAN BIESEN, W.; VANHOLDER, R., Acute renal failure. **Lancet**; v. 365, p. 417-427; 2005.
- LAW, M. R.; WALD, N. J.; THOMPSON, S. G. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? **BMJ**, v. 308, p. 367-372, 1994.
- LEE, A.; LEE, J. H.; BAEK, N. I.; KIM, D. H. Antihyperlipidemic Effect of Crocin Isolated from the Fructus of *Gardenia jasminoides* and Its Metabolite Crocetin. **Biol. Pharm. Bull**, v. 28, p. 2106-2110, 2005.
- LEE, S. J.; SAIKI, I.; HAYAKAWA, Y.; NUNOME, S.; YAMADA, H.; KIM, S. H. Antimetastatic and immunomodulating properties of a new herbal prescription, Bojung-bangam-tang. **Int. Immunopharmacol.**, c. 3, p. 147-157, 2003a.

- LEE, Y. L.; KIM, H. J.; LEE, M. S.; KIM, J. M.; HAN, J. S.; HONGE, K.; KWON, M. S.; LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a Sarcoma 180 inoculation model. **Exp. Anim.**, v. 52, p. 371-375, 2003b.
- LEIFA, F.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Effect of nutritional and environmental conditions on production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity, **Food Sci Technol Int.** v. 40, p. 30-35, 2006.
- LEONE, A. M.; PALMER, R. M.; KNOWLES, R. G.; FRANCIS, P. L.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Constitutive and inducible nitric oxide synthase incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 23790-23795, 1991.
- LI, PEI-JUNG; SHEN, CHUNG-GUANG. 2003. Method for propagating fungi using solid state fermentation, United State, Sun, 6558943 Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/6558943.html>> Acesso em: 20 out. 2003
- LIAO, J. K. Statin Therapy: Having the Good Without the Bad. **Hypertension**; v. 43, p. 1171-1172, 2004.
- LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Effects of the flavonoid quercetin and the natural dyes bixin and norbixin on blood parameters of rabbits. **Rev. Nutr.** vol.16, n. 3, p.305-314, 2003.
- LINDBLOM, C.M.; WACHENFELDT, E.; TRANVIK, L. J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. **J. Microbiol. Methods**, v. 59, p. 253– 262, 2004.
- LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. **J. Oxford Univers. Press - eCAM**; v. 2, n. 3; 285–299, 2005.
- LUIZ, R. C.; JORDÃO, B. Q.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murril mushroom organic extracts in wild type CHO (K₁) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. **Mut. Res.**, v. 528, p. 75-79, 2003.
- LULL, C.; WISCHERS, H. J.; SAVELKOUL, H. F. J. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. **Mediators of Inflammation**, v. 2, p. 63-80, 2005.
- MACHADO, M. P.; RODRIGUEZ FILHO, E.; TEREZAN, A. P.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. **Toxicol. in Vitro**, v. 19, p. 533-53, 200.
- MADHAVI, N.; DAS, U. N. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on survival of vineristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro, **Cancer Let**; v. 84, p. 31–41, 1994.

MAGRAM, J.; CONNAUGHTON, S. E.; WARRIER, R. R.; CARVAJAL, D. M.; WU, C. Y.; FERRANTE, J.; STEWART, C.; SARMIENTO, U.; FAHERTY, D. A.; GATELY, M. K. IL-12-Deficient Mice Are Defective in IFN γ Production and Type 1 Cytokine Responses. **Immunity**, v. 4, 471–481, 1996.

MALEK, T. J. R.; SCHMIDT, J. A.; SHEWACH, E. M. The murine IL-2receptor III. Cellular requirement for the induction of IL-2 receptor expression on T cell subpopulations. **J Immunol.**, v. 134, p. 2405-2413, 1985.

MANTOVANI, A.; BOTAZZI, B.; COLOTTA, F.; SOZZANI, S.; RUCO, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunol. Today**, v. 13, p.265-270, 1992.

MANZANO, E. C.; VASSEUR, L. S.; OMAR, M. P. Estrés oxidativo e hipertensión esencial: uma realidade clínica. **Invest biomed.**, v. 23, p.190-196, 2004.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p.12231-12234, 1993.

MASILAMA, S.; KNEPPER, M. A.; BURG, M. B. 2000. Urine concentration and dilution. In: Brenner, B.M. **The Kidney**. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 596-636.

MATILLA, P.; LAMPI, A. M.; RONKAINEN, R.; TOIVO, J.; PIIRONEN, V. Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. **Food Chem.**, v. 76, p. 293–298, 2002.

McCANDLESS, R F J. 1951 Master thesis, University of Florida in CHANG, HL; CHAO, GR; CHEN, CC; MAU, JL. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. **Food Chem.**, v. 74, p. 203-207, 2001.

MCL. Disponível em: <<http://www.mcl.tulane.edu>> Acesso em: 10 out. 2006.

MCLEOD, R. S.; LEBLANC, A. M.; LANGILLE, M. A.; MITCHELL, P. A.; CURRIE, D. L.. Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hepatic very-low-density lipoprotein metabolism1–4. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, p. 1169S–74S., 2004.

MENOLI, R. C. R. N.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L .R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. **Mut. Res.**, v. 496, p. 5-13, 2001.

MITCHELL, M. S. Combining chemotherapy with biological response modifiers in treatment of cancer. **J. Nat. Cancer Inst.**, Bethesda, v.80, p.1445-1450, 1998.

MIZUNO T. Cultivation of the medicinal mushroom royal sun *Agaricus-blazei* Murrill (Agaricomycetidae). **Int. J. Med. Mushr.**, v. 2, p.215-220, 2000.

MIZUNO, M.; KAWAKAMI, S.; SAKAMOTO, Y.; FUJITAKE, N. Macrophages stimulated by polysaccharide purified from *Agaricus brasiliensis* S. Wasser *et al.*, (Agaricomycetidae) enhance mRNA expression of Th1 cytokine including IL-12 and IL-18. **I. J. Med Mushr.**, v. 5, p 383-389, 2003.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERA, H.; TSUCHIDA H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid cultured *Agaricus blazei* Mill. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 47, n. 4, p. 707-714, 1999a.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharide from *Agaricus blazei* stimulate T-cell subsets in mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, p. 434-437, 1998.

MIZUNO, T. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. **Food a. Food Ingrid. J. Jpn.** V. 167, p.69-85, 1996 in: WASSER, S.P.; WEIS, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999b.

MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushroom: food function and medicinal utilization. **Food Rev. Int.** v. 11, p.7-21, 1995.

MIZUNO, T. Farmacological Effect and Nutritional Aliment of Mushrooms **Chem. Times**; v. 131, p. 12-21, 1989.

MIZUNO, T. Medicinal properties and clinical effects of culinary-medicinal mushroom *Agaricus blazei* Muriil. **Int. J. Mushr.**, vol.4, p. 299-312, 2002.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agric. Biol. Chem.** v. 54, p. 2889-2896, 1990a.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agric. Biol. Chem.**, v.54, p. 2897-2905, 1990b.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, F. **Patologia** – processos gerais. SP: Atheneu, 1999.

MONTGOMERY H. J., MONREAL C .M., YOUNG J. C., SEIFERTD K. A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. **Soil Biol. Biochem.**, v. 32, 1207-1217, 2000.

MUSSO, C. G.; GIORDANI, C.; STONSKI, E.; PERALTA, M.; BONETTO, A.; JAUREGUI, R.; ALGRANATI, L. Insuficiencia renal aguda con urea plasmatica normal **Rev Electron Biomed / Electron J Biomed**, v. 2, p. 69, 2004.

NAKAJIMA, A.; ISHIDA, T.; KOGA, M.; TAKEUCHI, T.; MAZDA, O.; TAKEUCHI, M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murrill on antibody-producing cells in mice. **Int. Immunopharmacol.**, v.2, p. 1205-1211, 2002.

NATHAN, C.; XIE, Q. Nitric oxide synthases: roles, tools and controls. **Cell**, v. 78, p. 915-918, 1994.

NOSRATOLA, V.; ZHENMIN, N. I.; FARIBA, O.; DEBRA, L.; TRNAVSKY-HOBBS. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expresión in hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, p. 957, 2000.

NUMATA, M.; ISODA, Y. **Kagaku to Kohgyo**, v. 3, p. 763-770, 1986.

NUVITAL. Disponível em: < <http://www.nuvital.com.br> > Acesso em: 10 fev. 2004.

O'SHEA, M.; BASSAGANYA-RIERA, J.; MOHEDE, I. C. M. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid 1–3. **Am J Clin Nutr**, 7v. 79, p. 1199S–206S, 2004.

OBJECTIS. Disponível em: <<http://abm.objectis.net/conceptos>> Acesso em: 03 maio 2005.

OHNO, N.; FURUKAWA, M.; MIURA, N. N.; ACACHI, Y.; MOTOI, M.; YADOMAE, T. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 24, p. 820-828, 2001.

OLIVEIRA, J. M.; JORDÃO, B. Q.; RIBEIRO, L. R.; EIRA, A. F.; MANTOVANI, M. S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p.1775-1780, 2002.

OMATA, N.; YASUTOMI, M.; YAMADA, A.; IWASAKI, H.; MAYUMI, M.; OHSHIMA, Y. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Selectively Inhibits the Acquisition of CD40 Ligand-Dependent IL-12-Producing Capacity of Monocyte-Derived Dendritic Cells and Modulates Th1 Immune Response1 **J. Immunol.**, v. 169, p. 4861–4866, 2002.

OPLETAL, L.; JAHODAR, L.; CHOBOT, V.; ZDANSKY, P.; LUKES, J.; BRATOVA, M.; SOLICHOVA, D.; BLUNDEN, G.; DACKER, C. G.; PATEL, A. V. Evidence for the antihyperlipidaemic activity of the edible fungus *Pleurotus ostreatus*. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 54, p. 240-243, 1997.

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, K.; MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus blazei*, JUN-17. **Yakugaku Zasshi. J. Pharmac. Soc. Japan**, (Abstract) v. 114, p. 342-350, 1994.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications**, New Delhi, Asiatech Publishers, Inc, (2001) 221 p.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, M.; AGUIAR, C. Determinação da concentração de β -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 312-316, 2003.

PECCOITS-FILHO, R. Diagnóstico de Doença Renal Crônica: Avaliação da Função Renal. **J. Bras Nefrol.** v. 26, p.4-5, 2004.

PERUSSIA, B.; TUTT, M. M.; QIU, W. Q.; KUZIEL, W. A.; TUCKER, P. V.; TRINCHIERI, G.; BENNETT, M.; RAVETCH, J. V.; KUMAR, V. Murine natural killer cells express functional Fc γ receptor II encoded by the Fc γ R α gene. **J. Exp. Med.**, v. 170, p.73-86, 1989.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion tests for cell viability. In: KOUSE, M. K. (ed.), **Tissue culture: methods and applications**. New York: Academic Press, 1973. p. 406-8.

PICK, E.; MIZEL, M. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

PINHEIRO, F.; FARIA, R. R.; CAMARGO, J. L. V.; SPINARDI-BARBISAN, A. L. T.; EIRA, A. F.; BARBISAN, L. F. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1543-1550, 2003.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Tech Fish Immunol.**, v. 4, p. 93-100, 1995.

PIZATO, N.; BONATTO, S.; PICONCELLI, M.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; NALIWAICO, K.; NUNES, E. A.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutr.**, v. 22, p. 425-432, 2006.

PROVITAS. Disponível em: <<http://www.provitas.de/InfoTexte/Agaricus>> Acesso em: 03 maio 2005.

PURDUE UNIVERSITY CYTOMETRY LABORATORIES: Disponível em: <<http://www.cyto.purdue.edu>> Acesso em: 10 out. 2006.

RANDOLPH, G. J.; INABA, K.; ROBBIANI, D. F.; STEINMAN, R. M.; MULLER, W. A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. **Immunity**, v. 11, p. 753-761, 1999.

REEVES, P. G.; NEILSEN, F. H.; FAHEY, G. C. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.

REIN, D.; MONNARD, I.; GERMAN, J. B.; BERGER, A. Screening of cholesterol absorption and synthesis inhibiting food ingredients in hamster models, **FASEB J.**, v. 14, A250, 2000.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. **Mut. Res.**, v. 544, p. 195-201, 2003.

RICKERT, R. C.; RAJEWSKI, K.; ROES, J. Impairment of T-cell dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD-19 deficient mice. **Nature**, v. 376, p. 352-355, 1995.

RODRIGUEZ LEÓN, J. A. *et al.*, A mathematical approach for the estimation of biomass production rate in solid state fermentation. **Acta Biotechnology**, v. 8, p. 307-310, 1988.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. SP.: Manole, 1999, 423 p.

- ROLINK, A.; GRAWUNDER, U.; WINKLER, T. H.; KARASUYAMA, H.; MELCHERS, F. IL-2 receptor α chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. **Int. Immunol.**, v. 6; p. 1257-1264, 1994.
- SATO, S.; ONO, N.; STEEBER, D. A.; PISETKY, D. S.; TEDDER, T. F. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. **J. Immunol.**, v. 157, p. 4371-4378, 1996.
- SATO, S.; STEEBER, D. A.; JANSEN, P. J.; TEDDER, T. F. CD19 expression levels regulate B lymphocyte development. Human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. **J. Immunol.**, v. 158, p. 4662-4669, 1997.
- SATOL, A. F.; SVIDZINSKI, A. E.; CONSOLARO, M. E. L.; BOER, C. G. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, p. 397-404, 2005.
- SCHREIBER, H. Tumor immunology. In: PAUL, W. (ed) **Fundam. Immunol.** 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p.1237-1270.
- SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS. Processo de produção de trigo para quibe. Disponível em: <<http://sbirt.ibict.br/upload/sbirt2997.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2006.
- SHIBATA, C. K. R.; DEMIATE, I. M. Cultivo e análise da composição química do cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murill). **Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 21-32, 2003.
- SHIMIZU, S.; KITADA, H.; YOKOTA, H.; YAMAKAWA, J.; MURAYAMA, T.; SUGYYAMA, K.; IZUMI, H.; YAMAGUCHI, N. Activation of the alternative complement pathway by *Agaricus blazei* Murill. **Phytomedicine**, v. 9, p. 536-545, 2002.
- SHIRAI, M.; IZUMI, H.; YAMAGAMI, T. Experimental transplantation models of mouse Sarcoma 180 mice for evaluation of anti-tumor drugs. **J Veterin. Med. Scien.**, v. 53, n. 4, p. 707-713, 1991.
- SHU, C. H.; WEN, B. J.; LIN, K. J. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF- α release capability of macrophages cell line RAW 264.7. **Biotechnol. Let.**, v. 25, p. 2061-2064, 2003.
- SMYTH, M. J.; TANIGUCHI, M.; STREET, S. E. The antitumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are dose and model dependent. **J Immunol.**, v. 165, p. 2665-2670, 2000.
- SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; IKEHARA, Y.; INAFUKU, K.; OKUBO, A.; SUNAO, Y. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions *in vitro*. **Cell Structure and Function.**, v. 26, p. 103-108, 2001a.
- SORIMACHI, K.; IKEHARA, Y.; MAEZATO, G.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S.; AKIMOTO, K.; AKIRA, N. Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of

cytopathic effect induced by Western Equine Encephalitis (WEE) virus on VERO cells *in Vitro*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 65, p. 1545-1647, 2001.

STAMETS, P. Techniques for the cultivation of the medicinal mushroom Royal Sun *Agaricus-blazei* Murrill (Agaricomycetidae). **Int. J. Med. Mushr.**, v. 2, p.151-160, 2000.

STIJVE, T.; AMAZONAS, M. A. A.; GILLER, V. Flavour and taste components of *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinem. – a new gourmet and medicinal mushroom. **Dtsch Lebensm.-Rundsch.**, v. 98, p. 448-453, 2002.

STITES, D. P. **Imunologia**. Rio de Janeiro: Prentice/Hall do Brasil, 1992.

STRASINGER, S. K. (2000), **Uroanálise & Fluidos biológicos**; 3^a ed., Editorial Premier, Brasil.

STUEHR, P. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc Nat Acad Sci**, v. 82, p. 7738–7742, 1985.

SUGIYAMA, K.; YAMAKAWA, A.; SAEKI, S. Correlation of suppressed linoleic acid metabolism with the hypocholesterolemic action of eritadenine in rats. **Lipids**, v. 32, p. 859-866, 1997.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murril and its mechanism of action. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1409-1413, 2001.

TAKEDA, Y.; TOGASHI, H.; SHINZAWA, H.; MIYANO, S.; ISHII, R.; TETSURU, K.; TAKEDA, Y.; SAITO, T.; SAITO, K.; HAGA, H.; MATSUO, T.; AOKI, M.; MITSUHASHI, H.; WATANABE, H.; TAKAHASHI, T. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma and review of literature. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 15, p. 1079-1086, 2000.

TAKEZAWA, R.-I.; WATANABE, Y.; AKAIKE, T. Direct evidence of macrophage differentiation from bone marrow cells in the liver: A possible origin of the Kupfer cell. **J. Biochem.**, v. 118, p. 1175-1183, 1995.

TAKIMOTO, H.; WAKITA, D.; KAWAGUCHI, K.; KUMAZAWA, Y. Potentiation of cytotoxic activity in naïve and tumor-bearing mice by oral administration of hotwater extracts from *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Biol Pharm Bull**, v. 27, p. 404–406, 2004.

TALORETE, T. P. N.; ISODA, H.; MAEKAWA, T. *Agaricus blazei* (Class Basidiomycotina) aqueous extract enhances the expression of c-Jun protein in MCF7 cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5162-5166, 2002.

TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Fed batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganodermic acid. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 31, p. 20-28, 2002.

TELLES FILHO, P. A. Asma brônquica – Resposta tardia da asma, 2005. Disponível em: <<http://www.asma-bronquica.com.br/medical/resposta-tardia-oxido-nitrico>> Acesso em: 24 mar. 2005.

TISDALE, M. J. Wasting in cancer. **J. Nutrit.**, vol. 129, p. 243-246, 1999.

URBEN, A. F. Caracterização morfológica e fisiológica de acessos de *Agaricus blazei* e *A. sylvaticus*. In: V Congresso Latino Americano de Micologia, 2005, Brasília. V Congresso Latino Americano de Micologia, 2005. p. 203-205.

WASSER, P. S. Review of Medicinal Mushrooms Advances: Good News from Old Allies. **Herbal Gram.**; v. 56, p. 28-33, 2002a.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, p. 258-274, 2002b.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. A.; NEVO, E.; STAMETS P.; da EIRA, A. F. Is a Widely Cultivated Culinary-Medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake Mushroom) Indeed *Agaricus blazei* Murill? **Int. J. Med. Mushr.**; v. 4, p. 267-290, 2002.

WASSER, S. P.; NEVO, E.; SOKOLOV, D.; RESHETNIKOV, S.; TIMOR-TISMENETSKY, T. Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations. **Int. J. Med. Mushr.**, v. 2, p. 1-21, 2000.

WASSER, S. P.; WEISS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). **Int. J. Med. Mushr.**, v. 1, p. 31-62, 1999.

WATANABE, T.; KAWASHITA, A.; ISHI, S.; MAZUMDER, T. K.; NAGAI, S.; TSUJI, K.; DAN, T. Antihypertensive effect of gamma-amino butyric acid-enriched *Agaricus blazei* on mild hypertensive human subjects. **J. Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi**. (Abstract), v. 50, p.167-173, 2003.

WATANABE, T.; YAMADA, T.; TAMAKA, H.; JIANG, S.; MAZUMDER, T. K.; NAGAI, S.; TSUJI, K. Antihypertensive effect of gamma-aminobutyric acid-enriched *Agaricus blazei* on spontaneously hypertensive rats. **J. Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi**. (Abstract), v. 49, p.166-173, 2002.

WOO, C.W.; MAN, R.Y.; SIOW, Y. L.; CHOY, P. C.; WAN, E. W.; LAU, C. S. O, K. *Ganoderma lucidum* inhibits inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **Mol Cell Biochem.**, v. 275, p. 165-71, 2005.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. Disponível em: <<http://www.worldgastroenterology.org/globalguidelines>> Acesso em: 30 out. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes>> Acesso em: 05 mai. 2005

- WRONISKI, E. Cogumelo, uma nova opção econômica. Disponível em: <<http://www.parana-online.com.br>> Acesso em: 28 mar. 2004.
- YANAKI T, ITO W, TABATA K, *et al.*, Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. **Biophys Chem**, v. 17, p. 337-342. 1983.
- YANG, B. K.; HA, J. H.; JEONG, S. C.; JEON, Y. J.; RA, K. S; DAS, S.; YUN, J. W.; SONG, C. H. Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from submerged mycelial culture of *Auricularia polytricha* in rats. **Biotechnol. Let.**, v. 24, p. 1319–1325, 2002.
- YANG, B. K.; PARK, J. B.; SONG, C. H. Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Herichium erinaceus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** vol. 67, p. 1292-1298, 2003.
- YOKOYAMA, W. M.; KIM, S.; FRENCH, A. R. The dynamic life of natural killer cells. **Annu Rev Immunol.**, v. 22, p. 405–429, 2004.
- YOSHIE, O.; IMAI, T.; NOMIYAMA, H. Chemokines in Immunity. **Adv.Immunol.**, v. 78, p.570110, 2001.
- YUAN, Z.; HEI, P. M.; CUI, J. H.; TAKEUCHI, H. Hypoglycemic effect of water soluble polysaccharide from *Auricularia auricula-judae* Quel on genetic diabetic KK-Ay mice. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, p. 1898-1903, 1998.
- ZHAO, X. R.; LIN, Q.; BROOKES, P. C. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? **Soil Biol. Biochem.**, v. 37, p. 311-317, 2005.
- ZHONG, B. Z., ZHON, Y. G. *et al.*, 1999. Genetic toxicity test of Yun Zhi polysaccharide (PSP). In: **Advanced Research in PSP**, 1999. Ed. Yang, Q-Y. The Hong Kong Association for Health Care Ltd., pp. 285-294.
- ZOU, X. Effects of Zn supplementation on the growth, amino acid composition, polysaccharide yields and anti-tumor activity of *Agaricus brasiliensis*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21, p. 261-264, 2005.
- ZUCKERBERG, C. **Estrutura e histoquímica del Sarcoma 180**. Bueno Aires, 1972. 55f. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade de Bueno Aires.

ANEXOS

Anexo 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

CERTIFICADO

Nº 070

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

Processo nº: 6043/04-09 Data de Aprovação: 15/03/04 11ª RO

Projeto de Pesquisa Título: AÇÃO NUTRACÊUTICA DE RAÇÃO ANIMAL SUPLEMENTADA COM COGUMELOS MEDICINAIS

Autores Vanete Soccol (responsável) Herta S. Dalla Santa (acad.) e colaboradores: Carlos Ricardo Soccol, Bonald C. Figueiredo José H. Cavalcante Lima e Rosália Rubel.

Departamento PB

Curitiba, 15 de março de 2004.


Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA
Secretário


Profa. Dra. ANETE CURTE FERRAZ
Presidente

Centro Politécnico - Caixa Postal 19031 - 81531-990 Curitiba, PR
Coordenação: anete@blo.ufrpr.br Tel: (41) 361-1722 - Fax: (41) 266-2042

Anexo 2

 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SETOR DE TECNOLOGIA CEPPA - CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS <small>CENTRO POLITÉCNICO - PRÉDIO DAS USINAS PILOTO - BLOCO B - SALA PP01 CX. P. 19.083 - FONES: (41) 308-3688 / 301-2195 - FAX: (41) 206-1647 e-mail: ceppa@engquim.ufpr.br - CEP 81531-990 - CURITIBA - PARANÁ</small>	
CERTIFICADO DE ANÁLISE	
Nº 68849	
PRODUTO: TRIGO INTEGRAL COZIDO FABRICANTE/PRODUTOR: Herta Stutz Dalla Santa SOLICITANTE: o mesmo ENDEREÇO: Centro Politécnico - Laboratório de Processos Biotecnológicos - Curitiba/PR PROTOCOLO DE RECEPÇÃO DE AMOSTRA Nº 315 - 10/02/04 AMOSTRA Nº 930/04	
RESULTADOS	
PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS	
Aflatoxina B ₁ (µg/Kg) *.....	< L.D.
Aflatoxina B ₂ (µg/Kg) *.....	< L.D.
Aflatoxina G ₁ (µg/Kg) *.....	< L.D.
Aflatoxina G ₂ (µg/Kg) *.....	< L.D.
Ocratoxina (µg/Kg) **.....	< L.D.
Obs.: * L.D. - (Limite de detecção < 15 µg/Kg). ** L.D. - (Limite de detecção < 500 µg/Kg).	
METODOLOGIA AOAC: Official methods of analysis of AOAC International. 17 th ed. Gaithersburg, 2000	
 Cristina Mara Guolo Winter CRF 5891 PR	
Curitiba, 02 de março de 2004.	
 Dr. Afên Zandoná Filho CRQ 092 000 67 Coordenador do Laboratório	 Prof. Carlos Hideo Yamamoto Chefe do CEPPA Matrícula UFPR 102911
OBSERVAÇÃO: - A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA. - AS INFORMAÇÕES CONSTANTES NESTE CERTIFICADO DE ANÁLISE SÃO CONFIDENCIAIS E PERTENCENTES AO SOLICITANTE. - É PERMITIDA A REPRODUÇÃO, DESDE QUE INTEGRALMENTE E SEM NENHUMA ALTERAÇÃO.	